

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

日本国特許庁 23.03.99  
 PATENT OFFICE  
 JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 Date of Application: 1998年 3月24日

REC'D 17 MAY 1999

WIPO PCT

出願番号 Application Number: 平成10年特許願第095448号

出願人 Applicant(s): 岸本 忠三  
 中外製薬株式会社

09/646785

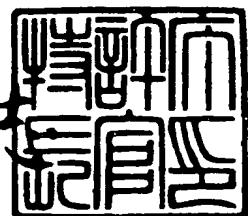
PRIORITY  
 DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
 COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 4月23日

特許庁長官  
 Commissioner,  
 Patent Office

伴佐山 建志



出証番号 出証特平11-3024631

【書類名】 特許願  
【整理番号】 P98XX-004  
【提出日】 平成10年 3月24日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 C07K 7/00  
C07H 21/00  
A61K 37/00  
A61K 39/00  
【発明の名称】 血管形成抑制剤  
【請求項の数】 4  
【発明者】  
【住所又は居所】 大阪府富田林市中野町三丁目5-31  
【氏名】 岸本 忠三  
【発明者】  
【住所又は居所】 大阪府堺市赤坂台一丁目50番地8号  
【氏名】 長沢 丘司  
【発明者】  
【住所又は居所】 大阪府堺市南花田町46-5-205  
【氏名】 橘 和延  
【特許出願人】  
【識別番号】 000157865  
【氏名又は名称】 岸本 忠三  
【特許出願人】  
【識別番号】 000003311  
【氏名又は名称】 中外製薬株式会社  
【代理人】  
【識別番号】 100088155  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 長谷川 芳樹

【選任した代理人】

【識別番号】 100089978

【弁理士】

【氏名又は名称】 塩田 辰也

【選任した代理人】

【識別番号】 100092657

【弁理士】

【氏名又は名称】 寺崎 史朗

【選任した代理人】

【識別番号】 100094318

【弁理士】

【氏名又は名称】 山田 行一

【選任した代理人】

【識別番号】 100107191

【弁理士】

【氏名又は名称】 長濱 範明

【選任した代理人】

【識別番号】 100110593

【弁理士】

【氏名又は名称】 杉本 博司

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 014708

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9804124

【書類名】 明細書

【発明の名称】 血管形成抑制剤

【特許請求の範囲】

【請求項1】 CXCR4阻害剤を有効成分として含有する血管形成抑制剤。

【請求項2】 CXCR4阻害剤を有効成分として含有する抗固形癌剤。

【請求項3】 CXCR4阻害剤を有効成分として含有する血管新生を病態形成要因とする疾患の治療剤。

【請求項4】 CXCR4増強剤を有効成分として含有する組織修復剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】

本発明は、CXCR4阻害剤を有効成分として含有する、新規血管形成抑制剤、抗固形癌剤、また、血管新生を病態形成要因とする疾患の治療剤に関する。さらに本発明はCXCR4増強剤を有効成分として含有する組織修復剤に関する。

【0002】

【従来の技術】

従来、腫瘍細胞が血管外に浸潤する際に、血管内皮細胞が開裂することが知られている。また、癌の増殖や転移には血管新生が深くかかわっており、腫瘍細胞が種々の血管新生因子を産生、放出することも知られている。特に、固形腫瘍の増殖には血管の新生が必須とされている。

【0003】

このため血管新生を阻害する物質は新しい作用機序を有する制癌剤になる可能性があるため、ステロイド剤や微生物代謝産物などいくつかのタイプの血管新生阻害物質がすでに試みられている（「がんの浸潤・転移研究マニュアル」がん転移研究会編、金芳堂発行、1994年、159～182ページ）が、癌の増殖、転移をより効果的に抑制する作用を有する新規な血管新生阻害物質の発見が切望されている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、癌の増殖、浸潤、転移をより効果的に抑制する作用を有するケモカインレセプター阻害剤を含む血管形成抑制剤、抗固形癌剤、また、血管新生を病態形成要因とする疾患の治療剤を提供する。さらに本発明は、ケモカインレセプター増強剤を有効成分として含有する組織修復剤を提供することを目的とする。

#### 【0005】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために銳意研究を進めた結果、CXCケモカインであるプレ-B細胞成長刺激因子／基質細胞誘導因子（以下PBSF/SDF-1またはSDF-1とする）およびケモカインレセプターであるCXCR4のノックアウトマウスを作製し、該マウスの血管の形成が抑制されること、すなわち、CXCR4を抑制することにより血管形成が抑制されることを見出した。係る知見は、ケモカインレセプターCXCR4が血管新生にとって必須であることを意味する。

#### 【0006】

生体組織の血管新生は、一般的に成長過程において特異的な機能を実現するため、すでに存在する血管系の再構成により起こる。初期の血管系において必須の分子は、そのほとんどがレセプターチロンシンキナーゼとそのリガンドであることが変異マウスの分析から決められてきた（Risau, W. *Nature* 386, 671-674 (1997)、Folkman, J. & D'Amore, P.A. *Cell* 87, 1158-1155 (1996)、Lindahl, P., et al., *Science* 277, 242-245 (1997)）。しかしながら係るマウスの多くは、組織発達前の初期妊娠時に死亡することから、器官形時期の血管形成に必要な物質はいまだ不明であった。

#### 【0007】

本発明に係るケモカインレセプターCXCR4の構造は既に知られている（Bleul, C. C. et al. *Nature* 382, 829-883 (1996)、Oberlin, E. et al. *Nature* 382, 888-835 (1996)、Nagashima, T. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 14726-14729 (1996)）。CXCR4は、7回膜貫通Gタンパク共役タンパク質であり、CXCケモカインであるPBSF/SDF-1のレセプターである。また、上記因子はBリンパ球産生、骨髄造血と心室壁形成に必要とされているものである（Nagashima, T. et al. *Nature* 382, 685-688 (1996)）。また、CXCR4は、T細胞系親和性のHIV-1のコ

レセプターとして機能するものもある(Feng, Y. et al. *Science* 272, 872-877 (1996))。CXCR4は、培養内皮細胞に発現していることも報告されている (Volin, M.V. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 242, 46-53 (1998))。

#### 【0008】

また、本発明者らは、上記CXCR4が、発生途上の血管内皮細胞に発現すること、CXCR4またはそのリガンドであるPBSF/SDF-1を欠くマウスにおいては、消化器系に供給される大型の血管の形成欠陥を示すを見出した。係る知見は、CXCR4及びPBSF/SDF-1シグナル系が消化管を栄養する中動脈の形成に必須であることを意味する。さらに、本発明者らは、CXCR4を欠くマウスは、胎生致死性であり、PGSF/SDF-1を欠くマウスで見られるのと同様であることを見出した。係る知見は、CXCR4がPBSF/SDF-1の生理的に最も主要なレセプターであることを示唆するものである。

#### 【0009】

本発明者らによる以上の知見に基づき、癌組織の維持、拡大において血管形成は必須であることから、CXCR4に基づく作用を阻害する物質は血管形成を阻害し、従って、有効な抗癌剤となることが考えられる。

#### 【0010】

また、同様にCXCR4を阻害する物質が、血管新生が関与する疾患の治療剤となることが考えられる。

#### 【0011】

さらに、CXCR4に基づく作用を促進することで、血管形成を促進し、血管形成が望まれる疾患の治療剤となることが考えられる。

#### 【0012】

より詳しくは、本発明は、以下にまとめたように、CXCR4に基づく作用を阻害する物質を有効成分とする血管形成抑制剤、抗固形癌剤、血管新生を病態形成要因とする疾患の治療剤を提供する。また、本発明はCXCR4に基づく作用を増強する物質を有効成分として含有する組織修復剤等を提供する。

#### 【0013】

すなわち、本発明は、CXCR4阻害剤を有効成分として含有する血管形成抑制剤

を提供する。

【0014】

本発明はまた、CXCR4阻害剤を有効成分として含有する抗固形癌剤を提供する。

【0015】

本発明はまた、CXCR4阻害剤を有効成分として含有する血管新生を病態形成要因とする疾患の治療剤を提供する。

【0016】

本発明はまた、CXCR4増強剤を有効成分として含有する組織修復剤を提供する。

【0017】

ある大きさを超えた癌組織の維持、拡大においてこの中等大動脈の形成は必須であるため、本発明に係る血管形成抑制剤は、CXCR4またはPBSF/SDF-1シグナル系をブロックし、癌組織の維持、拡大を抑制するものである。

【0018】

また、本発明により得られた知見は、CXCR4及びPBSF/SDF-1シグナル系が普遍的な血管形成に働いている可能性を示唆している。従って癌の種類や血管新生を重要な病態形成要因とする疾患によっては、CXCR4及びPBSF/SDF-1が病態形成に深く関与している可能性があり、この場合CXCR4またはPBSF/SDF-1を単独または他の分子と同時にブロックすることにより、これらの疾患を抑制できる可能性がある。

【0019】

なお、本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などに対する略号は、IUPAC-IUBCommission on Biochemistry Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用に基づく略号である。それらの例を以下に示す。またアミノ酸の場合は、光学異性体があり得るときは特に明示しない限りL体を示す。

【0020】

DNA：デオキシリボ核酸

cDNA：相補的デオキシリボ核酸

A : アデニン

T : チミン

G : グアニン

C : シトシン

RNA : リボ核酸

mRNA : メッセンジャー・リボ核酸

GあるいはGly : グリシン

AあるいはAla : アラニン

VあるいはVal : バリン

LあるいはLeu : ロイシン

IあるいはIle : イソロイシン

SあるいはSer : セリン

TあるいはThr : スレオニン

CあるいはCys : システイン

MあるいはMet : メチオニン

EあるいはGlu : グルタミン酸

DあるいはAsp : アスパラギン酸

KあるいはLys : リシン

RあるいはArg : アルギニン

HあるいはHis : ヒスチジン

FあるいはPhe : フェニルアラニン

YあるいはTyr : チロシン

WあるいはTrp : トリプトファン

PあるいはPro : プロリン

NあるいはAsn ; アスパラギン

QあるいはGln : グルタミン

BSA : ウシ血清アルブミン

FBS : ウシ胎児血清

PBS : リン酸緩衝生理食塩水

SDS：ドデシル硫酸ナトリウム

以下本発明を、実施の形態に従って詳細に説明する。

【0021】

【発明の実施の形態】

本発明に係る血管形成抑制剤、抗固形癌剤、又は血管新生を病態形成要因とする疾患の治療剤は、ケモカインレセプターであるCXCR4の作用を阻害する物質を有効成分として含む。また、本発明に係る組織修復剤は、該CXCR4の作用を増強する物質を有効成分として含有する。

【0022】

CXCR4のアミノ酸配列については、すでに知られている。具体的にはヒトCXCR4及びマウスCXCR4のアミノ酸配列は、各々配列番号1及び3に示される。また、ヒトCXCR4及びマウスCXCR4の塩基配列は、各々配列番号2（塩基位置1～1056）及び4（塩基位置1～1077）に示される。

【0023】

CXCR4に結合するリガンドであるSDF-1についても既にそのアミノ酸配列が知られている。SDF-1にはアミノ酸配列の長さが異なる2種類、すなわちSDF-1- $\alpha$ 及びSDF-1- $\beta$ が存在する。具体的にはヒトSDF-1- $\alpha$ のアミノ酸配列は配列番号5に、塩基配列は配列番号：6（塩基位置474～740）に示される。ヒトSDF-1- $\beta$ は、ヒトSDF-1- $\alpha$ のC末端側にさらに4つのアミノ酸残基Arg、Phe、Lys、Met（配列番号：9）が付加されている。

【0024】

マウスSDF-1- $\alpha$ のアミノ酸配列は配列番号：7に、塩基配列は配列番号：8（塩基位置82～348）に示される。マウスSDF-1- $\beta$ は、マウスSDF-1- $\alpha$ のC末端側にさらに4つのアミノ酸残基Arg、Leu、Lys、Met（配列番号：10）が付加されている。ヒト及びマウスSDF-1はアミノ酸1位のMetから21位のGlyまでがシグナル配列である。

【0025】

これまでに知られているCXCケモカインとしては、前記PBSF/SDF-1の他、IL-8

(Yoshimura., T. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.84,9233-9237 (1987) )  
、NAP-2 (Walz.A, et al., Biochem.Biophys.Res.Commun.,159, 969-975 (1989)  
) )、NAP-4, GRO  $\alpha$  (Richmondo,A. et al., J.Cell.Biochem.,36, 185-198 (1988) )、GRO  $\beta$  (Haskill,S. et al., Proc.Natl. Acad.Sci.U.S.A.87,77732-7736 (1990) )、GRO  $\gamma$  (Haskill, S. et al., (1990) 前出)、GCP-2(Prost, P. et al., J. Immunol.,150,1000-1010 (1993) 、ENA-78 (Wayz, A. et al., J.Exp.Med.,174,1355-1362 (1991) )、PF-4 (Deuel,T.F. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 74,2256-2258 (1977) )、及びIP-10 (Dewald, B. et al., Immunol.Lett.,32, 81-84 (1992) が挙げられる。

#### 【0026】

本発明において使用可能なCXCR4に基づく作用を阻害する物質については特に限定はされず、CXCR4に基づく作用を阻害し、結果として血管新生を阻害する物質であればよい。

#### 【0027】

具体的には、(i)リガンド (SDF-1) とレセプター (CXCR4) との結合自体を阻害することに基づく物質、(ii)CXCR4から核へのシグナル伝達を阻害することに基づく物質、(iii)CXCR4自体の発現を阻害する物質、(iv)SDF-1自体の発現を阻害する物質、が挙げられる。

#### 【0028】

(i)SDF-1とCXCR4との結合自体を阻害する物質として、SDF-1を阻害する物質とCXCR4を阻害する物質がある。

#### 【0029】

SDF-1を阻害する物質は、より具体的にはCXCR4に対しSDF-1と拮抗的に競合し阻害する物質とSDF-1に結合してCXCR4へのSDF-1の結合を阻害する物質がある。CXCR4に対しSDF-1と拮抗的に競合し阻害する物質として、具体的にはSDF-1と類似の構造を有する蛋白質、その蛋白質と他のペプチド又はポリペプチドとの融合蛋白質、SDF-1の部分ペプチド及びSDF-1の結合部位と類似の構造を有する低分子化合物等が挙げられる。

#### 【0030】

SDF-1に結合してCXCR4へのSDF-1の結合を阻害する物質として、具体的には抗SDF-1抗体、その結合活性を有する抗体断片、SDF-1に対する結合活性を有する融合タンパク質、SDF-1の構造変化を誘導する物質、及びSDF-1のCXCR4との結合部位に結合する低分子化合物等が挙げられる。

#### 【0031】

CXCR4を阻害する物質は、より具体的にはSDF-1との結合においてCXCR4と拮抗的に競合して阻害する物質とCXCR4に結合してSDF-1のCXCR4への結合を阻害する物質がある。SDF-1との結合においてCXCR4と拮抗的に競合して阻害する物質として、具体的にはCXCR4と拮抗的に阻害する可溶性CXCR4、CXCR4と類似の構造を有するタンパク質、そのタンパク質と他のペプチド又はポリペプチドとの融合タンパク質、又はCXCR4部分ペプチド及びCXCR4の結合部位と類似の構造を有する低分子化合物等が挙げられる。

#### 【0032】

CXCR4に結合してSDF-1のCXCR4への結合を阻害する物質として、具体的には抗CXCR4抗体、その結合活性を有する抗体断片、CXCR4に対する結合活性を有する融合タンパク質、SDF-1の構造変化を誘導する物質及びCXCR4のSDF-1結合部位に結合する低分子化合物等が挙げられる。

#### 【0033】

SDF-1とCXCR4との結合自体を阻害する物質の具体例は、T22(T.Murakami, et al. J.Exp.Med., 186, 1389-1393(1997)、ALX40-4C(J.Exp.Med., 186, 1395-1400(1997)、AMD3100 (J.Exp.Med., 186, 1383-1388(1997), Nat.Med., 4, 72-77(1998) ) 等である。これらの物質の作成方法については、例えばJ.Exp.Med., 186, 1189-1191(1997)に記載の方法に準じて可能である。

#### 【0034】

(ii) CXCR4から核へのシグナル伝達を阻害することに基づく物質としては、係る作用を有する物質であれば特に制限はない。CXCR4から核へのシグナル伝達を阻害することに基づく物質としては、Gタンパク共役タンパク質の下流に存在するシグナル伝達系の阻害剤、例えばMAPKカスケード阻害剤、ホスホライペースC(PLC) の阻害剤、PI3キナーゼ基ナーゼ阻害剤等が挙げられる。

## 【0035】

(iii) CXCR4自体の発現を阻害する物質として、細胞上からみかけ上CXCR4を消失させる物質及びCXCR4自体の発現を阻害する物質が挙げられる。細胞上からみかけ上CXCR4を消失させる物質とは、具体的にはCXCR4のダウンレギュレーションを誘導する物質である。CXCR4のダウンレギュレーションの誘導とは、具体的には細胞膜に作用して細胞膜の流動性を変化させ、細胞膜上からCXCR4を消失させる作用を意味する。このような作用を有する物質として、例えばデキサメタゾン等が挙げられる。

## 【0036】

CXCR4自体の発現を阻害する物質として、具体的にはアンチジーン、アンチセンス（アンチセンスオリゴヌクレオチド、アンチセンスペクターにより発現されるアンチセンスRNA）、リボザイム及びCXCR4の発現調節部位、例えばプロモーターやエンハンサー等に対し阻害する物質が挙げられる。

## 【0037】

後述の実施例において、CXCR4遺伝子の一部を含むベクターを用いてCXCR4を欠損させたことにより、血管形成が抑制されたことが明らかとなった。従って、CXCR4のアンチジーン、アンチセンス又はリボザイム等によりCXCR4を阻害すれば、血管形成が抑制される。

## 【0038】

本発明で好ましく使用可能なアンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、CXCR4遺伝子、CXCR4に対するSDF-1の遺伝子、又はCXCR4に基づくシグナル系に関わる物質の遺伝子と選択的にハイブリダイズし得るヌクレオチド（DNA又はRNA）又はヌクレオチド誘導体、例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド等が含まれる。本発明は例えば、配列番号：2に示されるヒトCXCR4遺伝子の塩基配列中のいずれかの箇所にハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。

## 【0039】

このアンチセンスオリゴヌクレオチドは、好ましくは配列番号：2に示される塩基配列中の連続する少なくとも20個以上のヌクレオチドに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドである。さらに好ましくは、前記連続する少なくとも20個以

上のヌクレオチドが翻訳開始コドンを含む、前記のアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

【0040】

ここでいう「アンチセンスオリゴヌクレオチド」とは、DNA又はmRNAの所定の領域を構成するヌクレオチドに対応するヌクレオチドが全て相補的であるもののみならず、DNA又はmRNAとオリゴヌクレオチドとが配列番号：2に示される塩基配列に選択的に安定にハイブリダイズできる限り、1又は複数個のヌクレオチドのミスマッチが存在していてもよい。選択的に安定にハイブリダイズするとは、少なくとも20個、好ましくは30個の連続したヌクレオチド配列領域で、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%以上の塩基配列上の相同性を有するものを示す。

【0041】

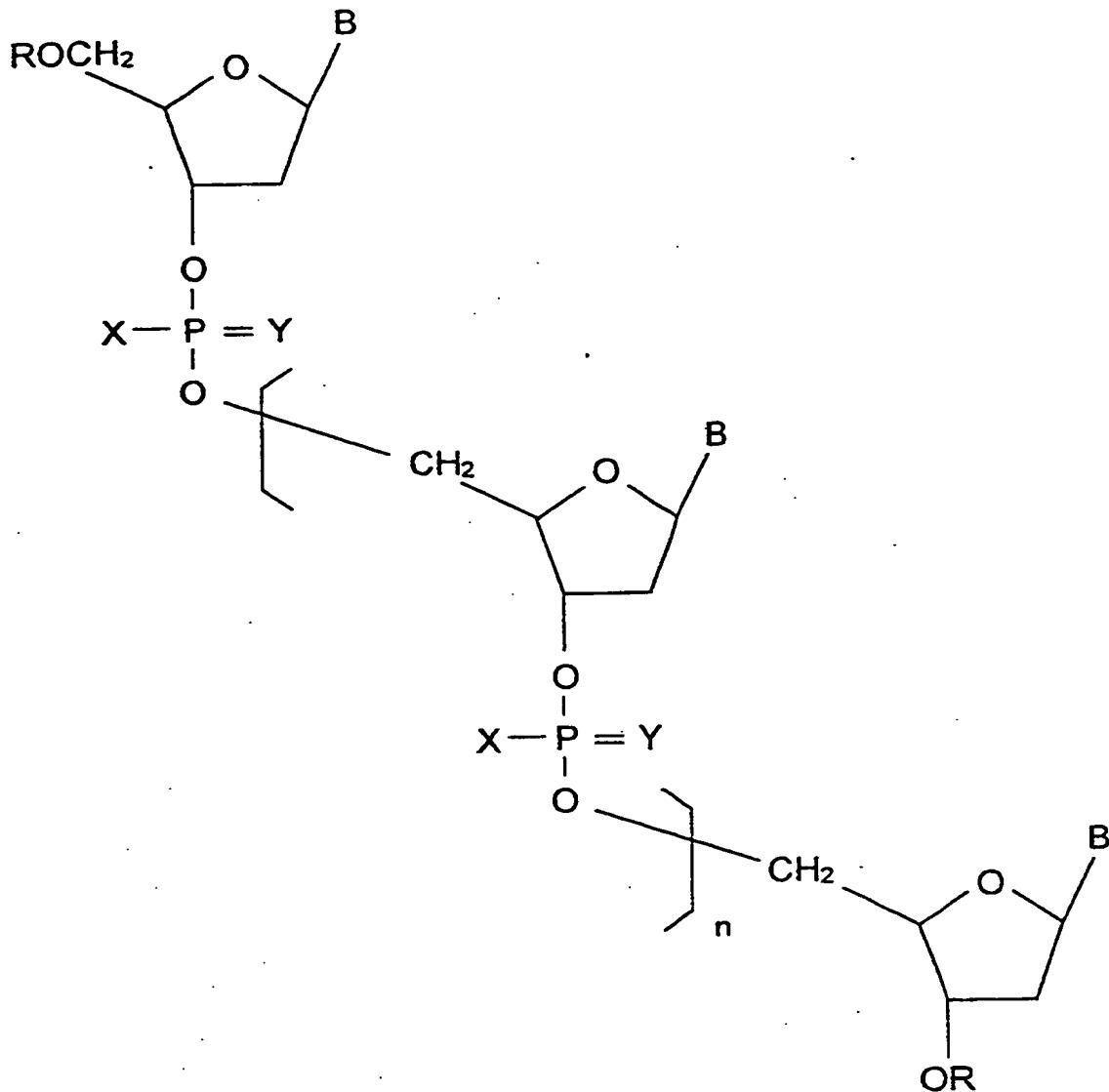
尚、本明細書において相同性とは同等性（Identity）を示す。

【0042】

本発明において便用されるオリゴヌクレオチド誘導体がデオキシリボヌクレオチドの場合、各々の構造は化1に示したとおりである。

【0043】

【化1】



【0044】

ここで、Xは独立して酸素 (O) 、イオウ (S) 、低級アルキル基あるいは一級アミン又は二級アミンのいずれであってもよい。Yは独立して酸素 (O) あるいはイオウ (S) のいずれでもよい、Bはアデニン、グアニン、チミン、あるいはシトシンのいずれかから選ばれ、主としてヒトCXCR4遺伝子のDNA又はmRNAの相補的オリゴヌクレオチドである。Rは独立して水素 (H) 又はジメトキシトリチル基ある

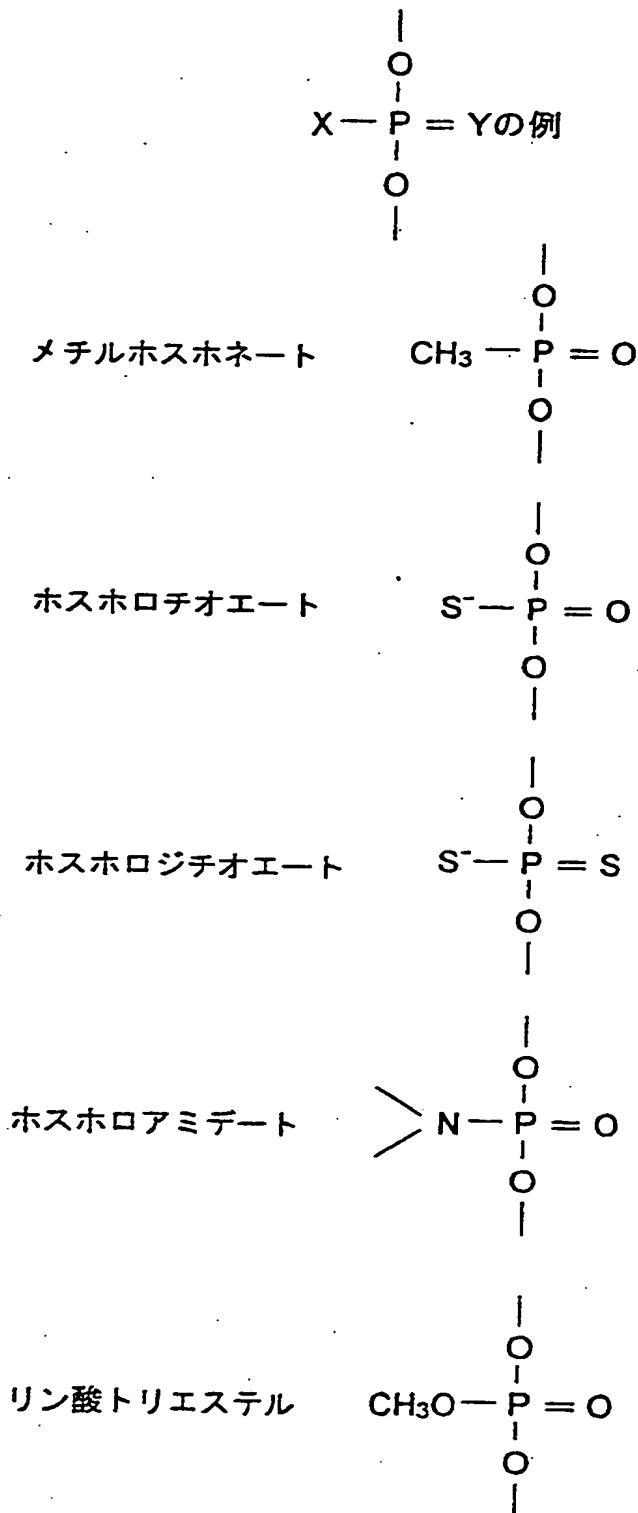
いは低級アルキル基である。 $n$ は7-28である。

【0045】

好ましいオリゴヌクレオチド誘導体としては、修飾されていないオリゴヌクレオチドだけではなく、下に示すごとく、修飾されたオリゴヌクレオチドでもよい。このような修飾体として、例えばメチルホスホネート型又はエチルホスホネート型のような低級アルキルホスホネート修飾体、ホスホロチオエート修飾体又はホスホロアミデート修飾体等が挙げられる。

【0046】

【化2】



## 【0047】

これらのオリゴヌクレオチド修飾体は、次の通り常法により得ることができる。化1のX及びYが0であるオリゴヌクレオチドは市販のDNA合成装置、例えばApplied Biosystems製によって容易に合成される、合成方法はホスホロアミダイトを用いた固相合成法、ハイドロジエンホスホネートを用いた固相合成法等で得ることができる。

## 【0048】

Xが低級アルコキシ基であるリン酸トリエステル修飾体は、常法、例えば化学合成で得られたオリゴヌクレオチドをトシリクロリドのDMF／メタノール／2, 6-二チジン溶液で処理することにより得ることができる。Xがアルキル基であるアルキルホスホネート修飾体は、常法、例えばホスホアミダイトを用いて得ることができる。XがSであるホスホチオエート修飾体は、常法、例えばイオウを用いた固相合成法あるいはテトラエチルチウラムジスルフィドを用いて、固相合成法により得ることができる。X、Yが共にSであるホスホジチオエート修飾体は、例えばビスマミダイトをチオアミダイトに変換し、イオウを作用させることにより固相合成法により得ることができる。Xが一級アミンあるいは二級アミンであるホスホアミデート修飾体は、例えばハイドロジエンホスホネートを一級あるいは二級アミンで処理することにより固相合成法により得ることができる。あるいは、アミダイトをtert-ブチルハイドロパーオキサイドで酸化しても得ることができる。

## 【0049】

精製及び純度確認は、高速液体クロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で行うことができる。分子量の確認は、Electrospray Ionization Mass Spectrometry又はFast Atom Bombardment-Mass Spectrometryで行うことができる。

## 【0050】

本発明で使用されるアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、CXCR4レセプター又はそのリガンド、さらにCXCR4に基づくシグナル伝達物質の產生細胞に作用して、該ポリペプチドをコードするDNA又はmRNAに結合することにより、その

転写又は翻訳を阻害したり、mRNAの分解を促進したりして、該ポリペプチドの発現を抑制することにより、結果的にCXCR4に基づく作用を阻害する効果を有する。

#### 【0051】

本発明で使用されるアンチセンスオリゴヌクレオチドは結果として血管の新生を阻害することにおいて有用である。また、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含有する血管新生阻害剤は、癌、特に固形癌の治療剤として有用である。

#### 【0052】

CXCR4アンチセンスベクターを作製するには、通常用いられる方法に従えばよい。すなわち、CXCR4をコードするcDNAをAAVベクター（アデノ随伴ベクター）、MLVベクター（マウス白血病ウィルスベクター）、又はHIVベクター等にアンチセンス方向に連結する。アンチセンス方向とは、プロモーターの下流に導入するcDNAの3'側から連結することを意味する。これらのベクターに含まれるcDNAから合成されたアンチセンスRNAは、宿主のCXCR4の発現を構成的に抑制する。

#### 【0053】

アンチセンスDNA又はRNAは、例えばリポソーム法、HVJリポソーム法、正電荷リポソーム法等の手段を用いて細胞に導入することができる。CXCR4アンチセンスDNA又はRNAを導入することにより、構成的にCXCR4の発現を阻害する事が可能である。

#### 【0054】

(iv) CXCR4に対するSDF-1自体の発現を阻害する物質として、SDF-1の発現阻害のためのアンチセンス及びSDF-1の発現調節部位、例えばプロモーター等に対し阻害する物質が挙げられる。

#### 【0055】

上述した本発明で使用可能な抗体、例えば抗SDF-1抗体又は抗CXCR4抗体は、公知の手段を用いてポリクローナルまたはモノクローナル抗体として得ることができる。本発明で使用される抗体として、特に哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。哺乳動物由来のモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマに産

生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主に產生されるものがある。この抗体は上述の性質を有する抗体である。

## 【0056】

抗体產生ハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、所望の抗原を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナル抗体產生細胞をクローニングする。

## 【0057】

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはげっ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター等が使用される。感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。

## 【0058】

前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としての哺乳動物のミエローマ細胞は、すでに、公知の種々の細胞株が適宜使用される。前記免疫細胞とミエローマ細胞の細胞融合は基本的には公知の方法、たとえば、ミルステインらの方法 (Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73 : 3-46) 等に準じて行うことができる。

## 【0059】

得られたハイブリドーマは、通常の選択培養液、例えば、HAT培養液（ヒポキサンチン、アミノブテリンおよびチミジンを含む培養液）で培養することにより選択される。当該HAT培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間、通常数日～数週間継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を產生するハイブリドーマのスクリーニングおよびクローニングが行われる。このように得られたハイブリドーマから通常用いられる方法に従い抗体を取得すればよい。

## 【0060】

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球を *in vitro* で所望の抗原蛋白質または抗原発現細胞で感作し、感作Bリンパ球をヒトミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、所望の抗原または抗原発現細胞への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる。さらに、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原または抗原発現細胞を投与し、前述の方法に従い所望のヒト抗体を取得してもよい。

#### 【0061】

本発明には、モノクローナル抗体として、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて產生させた組換え型抗体を用いることができる（例えば、Carl, A.K.Borrenbaeck, James, W. Larrick, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD 1990参照）。

#### 【0062】

また、本発明には、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ (Chimeric) 抗体（欧州特許出願公開番号EP125023）、ヒト型化 (Humanized) 抗体（欧州特許出願公開番号EP125023）を使用できる。これらの抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。

#### 【0063】

キメラ抗体はヒト以外の哺乳動物由来抗体の可変領域とヒト抗体由来の定常領域 (C領域) からなり、ヒト型化抗体はヒト以外の哺乳動物由来抗体の相補性決定領域とヒト抗体由来のフレームワーク領域 (framework region; FR) およびC領域からなり、ヒト体内における抗原性が低下しているため、本発明における有効成分として有用である。

#### 【0064】

本発明で使用される抗体は、本発明に好適に使用され得るかぎり、抗体の断片やその修飾物であってよい。例えば、抗体の断片としては、Fab、F(ab')<sup>2</sup>、Fv またはH鎖とL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェインFv (scFv) が挙げられる。具体的には、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンで処理

し抗体断片を生成させるか、または、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる。

#### 【0065】

本発明に使用される抗体を取得するために、ファージライブラリー法を用いることができる。（Marks, C. et al., *The New England Journal Medicine* 335, 730-733）例えばヒトB細胞よりヒト抗体V領域、例えばscFvをコードする遺伝子からなるcDNAライブラリーを得、このcDNAライブラリーをファージベクターに、例えばM13ファージ表面提示ベクターに導入し、これを大腸菌に感染させる。大腸菌でcDNAライブラリーは発現され、細胞表面に抗体V領域が産生される。所望の抗原をコートしたプレートに上で、抗原結合活性に基づいて選択することにより、所望の抗体をコードする遺伝子を得ることができる。

#### 【0066】

ファージライブラリー法を応用してチェインシャッフリング法を用い、抗原に対しより強い結合活性を有する抗体を得ることができる。（Akamatsu, Y. & Tsurushita, N. *Medical Immunology* 27, 273-286 (1994)）。すなわち、いったん分離した抗体遺伝子のV領域の一方（例えばVH）を固定し、B細胞から調製したもう一方（例えばVL）混合体との間で新たにライブラリーを作製し、抗原により強く結合するクローニングを分離すればよい。

#### 【0067】

また、抗体のアミノ酸配列に人為的突然変異を導入することによっても、抗原に対しより強い結合活性を有する抗体を得ることができる。（Akamatsu, Y. & Tsurushita, N. *Medical Immunology* 27, 273-286 (1994)）。すなわち、クローニングした抗体V領域をコードする遺伝子に突然変異を導入し、この遺伝子を上記ファージライブラリー法で発現させることにより、抗原に対しより強い結合活性を有する抗体をコードする遺伝子を得ることができる。

#### 【0068】

これら抗体の断片は、前記と同様にしてその遺伝子を取得し発現させ、宿主により産生させることができる。本明細書でいう「抗体」にはこれらの抗体の断片も包含される。

## 【0069】

抗体の修飾物として、ポリエチレングリコール(PEG)等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。本明細書でいう「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これら的方法はこの分野においてすでに確立されている。

## 【0070】

前記のように発現・產生された抗体は、通常用いられる方法に従い、宿主細胞内外から分離し均一にまで精製することができる。また、濃度測定は吸光度の測定またはELISA等により行うことができる。

## 【0071】

本発明で使用されるCXCR4阻害物質として、SDF-1又はCXCR4と類似の構造を有するタンパク質(類似構造タンパク質)が挙げられる。この物質は、SDF-1又はCXCR4との結合活性を有し、且つその生物学的活性を伝達しない物質である。即ちCXCR4に対しSDF-1と競合的に結合するが、SDF-1の生物学的活性を伝達しないため、SDF-1によるシグナル伝達を遮断する。

## 【0072】

SDF-1類似構造タンパク質は、SDF-1のアミノ酸配列のアミノ酸残基を置換することにより変異を導入して作製される。SDF-1類似構造タンパク質のもととなるSDF-1はその由来を問わないが、抗原性等を考慮すれば、好ましくはヒトSDF-1である。具体的には、SDF-1のアミノ酸配列を公知の分子モデリングプログラム、たとえば、WHATIF (Vriend et al., J. Mol. Graphics (1990) 8, 52-56) を用いてその二次構造を予測し、さらに置換されるアミノ酸残基の全体に及ぼす影響を評価することにより行われる。

## 【0073】

適切な置換アミノ酸残基を決定した後、ヒトSDF-1遺伝子をコードする塩基配列を含むベクターを鋳型として、通常行われるPCR(ポリメラースチェインリアクション)法によりアミノ酸が置換されるように変異を導入することにより、SDF-1類似構造タンパク質をコードする遺伝子が得られる。これを必要に応じて適

当な発現ベクターに組み込み、前記組換え型抗体の発現、產生及び精製方法に準じてSDF-1類似構造タンパク質を得ることができる。SDF-1類似構造タンパク質として、N末端を欠失させたSDF-1が知られている(EMBO J. (1997) 16,6996-7007)

本発明で使用されるSDF-1部分ペプチド又はCXCR4部分ペプチドは、各々CXCR4あるいはSDF-1との結合活性を有し、且つSDF-1の生物学的活性を伝達しない物質である。即ち、SDF-1部分ペプチド又はCXCR4部分ペプチドはCXCR4又はSDF-1に結合し、これらを捕捉することによりSDF-1のCXCR4への結合を特異的に阻害する。その結果、SDF-1の生物学的活性を伝達しないため、SDF-1によるシグナル伝達を遮断する。

#### 【0074】

SDF-1部分ペプチド又はCXCR4部分ペプチドは、SDF-1又はCXCR4のアミノ酸配列においてSDF-1とCXCR4との結合に係わる領域の一部又は全部のアミノ酸配列からなるペプチドである。このようなペプチドは、通常10～80、好ましくは20～50、より好ましくは20～40個のアミノ酸残基からなる。

#### 【0075】

SDF-1部分ペプチド又はCXCR4部分ペプチドは、SDF-1又はCXCR4のアミノ酸配列において、SDF-1とCXCR4との結合に係わる領域を特定し、その一部又は全部のアミノ酸配列を通常知られる方法、例えば遺伝子工学的手法又はペプチド合成法により作製することができる。

#### 【0076】

SDF-1部分ペプチド又はCXCR4部分ペプチドを遺伝子工学的手法により作製するには、所望のペプチドをコードするDNA配列を発現ベクターに組み込み、前記組換え型抗体の発現、產生及び精製方法に準じて得ることができる。

#### 【0077】

SDF-1部分ペプチド又はCXCR4部分ペプチドをペプチド合成法により作製するには、ペプチド合成において通常用いられている方法、例えば固相合成法又は液相合成法を用いることができる。具体的には、統医薬品の開発第14巻ペプチド合成 監修矢島治明廣川書店1991年に記載の方法に準じて行えばよい。固相合成法としては、例えば有機溶媒に不溶性である支持体に合成しようとするペプチドの

C末端に対応するアミノ酸を結合させ、 $\alpha$ -アミノ基及び側鎖官能基を適切な保護基で保護したアミノ酸をC末端からN末端方向の順番に1アミノ酸ずつ結合させる反応と樹脂上に結合したアミノ酸又はペプチドの $\alpha$ -アミノ基の該保護基を脱離させる反応を交互に繰り返すことにより、ペプチド鎖を伸長させる方法が用いられる。固相ペプチド合成法は、用いられる保護基の種類によりBoc法とFmoc法に大別される。

#### 【0078】

このようにして目的とするペプチドを合成した後、脱保護反応及びペプチド鎖の支持体から切断する。ペプチド鎖との切断反応には、Boc法ではフッ化水素又はトリフルオロメタンスルホン酸を、又Fmoc法ではTFAを通常用いることができる。Boc法では、例えばフッ化水素中で上記保護ペプチド樹脂をアニソール存在下で処理する。次いで、保護基の脱離と支持体から切断しペプチドを回収する。これを凍結乾燥することにより、粗ペプチドが得られる。一方、Fmoc法では、例えばTFA中で上記と同様の操作で脱保護反応及びペプチド鎖の支持体から切断反応を行うことができる。

#### 【0079】

得られた粗ペプチドは、HPLCに適用することにより分離、精製することができる。その溶出にあたり、蛋白質の精製に通常用いられる水-アセトニトリル系溶媒を使用して最適条件下で行えばよい。得られたクロマトグラフィーのプロファイルのピークに該当する画分を分取し、これを凍結乾燥する。このようにして精製したペプチド画分について、マススペクトル分析による分子量解析、アミノ酸組成分析、又はアミノ酸配列解析等により同定する。

#### 【0080】

本発明で使用されるSDF-1の部分ペプチドあるいはCXCR4の部分ペプチドは、各々CXCR4あるいはSDF-1に結合し、シグナルの伝達活性がないものであれば、その配列を問わない。SDF-1の部分ペプチドおよびCXCR4のペプチドについては、既に知られたアミノ酸配列を使用できる。例えば、リガンドとしてSDF-1の場合、配列表の配列番号5(ヒト)、および7(マウス)に記載されたアミノ酸配列が使用可能である。

## 【0081】

本発明において使用可能なCXCR4に基づく作用を増強する物質については特に限定されないが、SDF-1を増強する物質として、SDF-1自体、SDF-1のアゴニスト、又はSDF-1の発現増強剤が挙げられる。さらに、レセプターCXCR4を増強する物質としては、CXCR4自体、そのアゴニスト、又はCXCR4の発現増強剤が挙げられる。

## 【0082】

上記説明したように、本発明に係るCXCR4阻害剤を有効成分として含む血管形成抑制剤を用いることにより、血管形成 (Vascularization) を抑制可能となることから、 固形癌に対する抗腫瘍効果（血管新生の抑制）血管肉腫（血管自体の癌）カボシ肉腫に対して抗腫瘍効果が発揮される。また、血管新生を病態形成要因とする疾患、具体的には慢性関節リウマチ、乾せん (psoriasis) 、糖尿病性網膜症に対して治療効果が発揮される。

## 【0083】

CXCR4の作用を増強する物質を含む血管新生を病態形成要因とする疾患の治療剤を用いることにより、血管新生を促進させることが可能となり、心筋梗塞、術後の血管新生を伴う疾患、具体的には創傷治癒、骨の修復及びリモデリング (remodeling) 、軟骨の修復、毛髪の成長、心筋梗塞、脳梗塞および脳における外傷に対する治療効果が発揮される。

## 【0084】

本発明において使用可能な血管新生阻害及び促進試験法は血管新生試験法を用い得る。このアッセイ方法についても特に制限はなく、通常公知の方法が好ましく使用できる（「がんの浸潤・転移研究マニュアル」がん転移研究会編、金芳堂発行、1994年、159～182ページ）。具体的には、(i)血管内皮細胞への影響を、腫瘍細胞が血管外に浸潤する際、血管内皮細胞が開裂するという知見に基づく血管内皮細胞間隔の開裂を測定する方法 (FITC-dextranの透過性から)、(ii)血管新生誘導因子としてその役割を生体内で発揮する候補因子を同定するためのin vivo測定法として知られている角膜法、及び(iv)CAM法 (chickembryochorioallantoic membrane) 、(v)肉眼で誘導血管の量を測定する背部皮下法、(vi)血管

内皮細胞の管腔形成の測定方法等が挙げられる。

【0085】

抗腫瘍効果の確認には、移植モデルや移植転移モデルを用いたin vivo実験又は癌細胞in vitro実験が挙げられる。具体的には、「がんの浸潤・転移研究マニュアル」がん転移研究会編、金芳堂発行、1994年、7~158ページに記載の方法を使用することができる。

【0086】

本発明に係る血管形成抑制剤、抗固形癌剤、治療剤、組織修復剤等は、経口的に全身あるいは局所的に投与することができる。例えば、点滴などの静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射を選択することができ、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。

【0087】

有効投与量は、一回につき体重1kgあたり0.09mgから100mgの範囲で選ばれる。あるいは、患者あたり1~1000mg、好ましくは5~50mgの投与量を選ぶことができる。

【0088】

本発明に係る血管形成抑制剤、抗固形癌剤、治療剤、組織修復剤等は、投与経路次第で医薬的に許容される担体や添加物と共に含むものであってもよい。このような担体および添加物の例として、水、医薬的に許容される有機溶媒、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターーチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、ジグリセリン、プロピレン glycole、ポリエチレン glycole、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン (HSA)、マンニトール、ソルビトニル、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤などが挙げられる。

【0089】

使用される添加物は、剤型に応じて上記の中から適宜あるいは組合せて選択さ

れるが、これらに限定されるものではない。

【0090】

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの例によって何等限定されるものではない。

【0091】

【実施例】

CXCR4完全欠損マウスの作製および分析

CXCR4遺伝子座を含むゲノムDNAを、マウス株129DNAライブラリー（Stratagene社）から単離した。

【0092】

エクソン2の5'翻訳領域を含む1.1kbゲノム断片をネオマイシン耐性遺伝子で置き換え、ヘルペスシンプレックスチミジンキナーゼ遺伝子を5'末端に連結した。

【0093】

胚形成の14.1日（以下、E14.1とする）の細胞内に標的ベクターをエレクトロポレーションにより導入し、G418とガンシクロビルにより相同性組換えを選択し、PCRで同定した。

【0094】

変異座の構造とES細胞コロニーでの単一の挿入物の存在をサザンハイブリダイゼーションで確認した。Nagasawa, T. et al.. Nature 382, 685-688 (1996)に記載の方法にしたがい、未分化胚芽細胞の注入により変異マウスを作製するために変異ES細胞コロニーを用いた。

【0095】

サザンハイブリダイゼーション分析のため、テールDNAをEcoRIで消化し、ナイロンメンブレンに移し、5'側相同領域の550bpのプローブAとハイブリダイズさせた。

【0096】

E18.5の胚の胎仔肝臓から単離した3μgの全RNAを出発材料として標準の方法に従いRT-PCRを40サイクル行った。630bpのPCR産物をCXCR4特異的プライマー、すな

わち前方プライマー（配列番号：11）及び後方プライマー（配列番号：12）を用いて増幅した。組織学的分析及びフローサイトメトリー分析はNagasaki, T. et al. *Nature* 382, 685-688 (1996)に記載の方法に準じて行った。

#### 【0097】

免疫組織学的染色は、Adachi, S., Yoshida, H., Kataoka, H. Nishikawa, S.-I. *Int. Immunol.* 9, 507-514の方法に準じた。胚及び器官の切片を4%パラホルムアルデヒドで固定し、メタノールで脱水し、メタノール中30%過酸化水素で脱色し、再度水和した。

#### 【0098】

PBSMT(1%スキムミルク粉および0.3%v/v TritonX-100を含むPBS)でインキュベートした後、試料をPBSMT中、1:250希釈した抗-PECAM抗体(PharMingen)と4℃一晩インキュベートした後、PBSMTで洗浄し、1:500希釈ホースラディッシュペーパーオキシダーゼ標識抗ラットIg抗体(Biosource製)とPBSMT中4℃一晩インキュベートした。

#### 【0099】

その後、試料をよく洗浄し、胚を250 μg/mlジアミノベンジジン(同仁化学製)、0.08%NiCl<sub>2</sub>を含むPBS中で30分インキュベートした。過酸化水素を加えて、最終濃度0.01%としてペーパーオキシダーゼ染色を行った。反応は約30分後に止めた。

#### 【0100】

Nagasaki, T. et al. *Nature* 382, 685-688 (1996)に記載の方法により、マウスCXCR4又はPBSF/SDF-1cDNAの断片をプローブとしてアンチセンス転写を用いて行った。

#### 【0101】

CXCR4の生理的機能を決定するため、CXCR4欠損マウスを作製した。すなわち、CXCR4遺伝子のうち、レセプター機能に重要なすべての膜貫通領域を含むエクソン2の大部分を削除し、その部分をネオマイシン耐性遺伝子(neo)で置換できるようにしたターゲットベクターを構築した。この結果、相同組換え後、実質的にCXCR4遺伝子が完全に削除されることとなる。

## 【0102】

図1は、CXCR4遺伝子の標的戦略を示す図（上、中、下とする）である。上には、野生型CXCR4対立遺伝子、中には標的ベクター、および下には予想変異対立遺伝子を示す。遺伝子の翻訳領域は黒四角で示される。白四角は5'および3'非翻訳領域を示す。点線は、標的ベクターに使用された相同な断片を示す。プローブAは、サザンハイブリダイゼーション用の外部プローブである。ここで制限酵素位置をそれぞれ、E、EcoRI；Sh、SphI；X、XbaIとした。

## 【0103】

図2の(a)は、野生型(+/+)およびヘテロ変異(+/-)マウスのテールDNAのサザンプロット分析を示す写真である。プローブAにより同定された、11.8kb野生型および8.2kb標的対立遺伝子のEcoRI-EcoRI断片が示されている。また、図2の(b)は、CXCR4発現のRT-PCR增幅分析を示す写真である。全RNAはE18.5の野生型およびホモ変異胚から調製し、さらにCXCR4特異的プライマーで増幅した。RT-PCR増幅はまた、増幅可能なRNAの存在のコントロールとして、普遍的に発現しているG3PDH mRNAを用いた。

## 【0104】

CXCR4ヘテロ(+/-)変異を有するマウスを作製した。該マウスは健康でかつ妊娠可能であった。CXCR4ホモ(-/-)変異胚は胚形成のE15.5まで予想された比で存在した。しかし、既に報告しているPBSF/SDF-1欠損マウスと同様に(Nagasaki, T. et al. Nature 382, 685-688 (1996))、約半分のCXCR4-/-胚はE18.5で死亡し、CXCR4-/-新生仔は1時間以内に死亡した。

## 【0105】

胚形成時において、CXCR4の機能を明らかにするために、CXCR4の成育中の胚における発現をin situハイブリダイゼーションにより調べた。CXCR4転写物が、胚形成時において血管形成時の内皮に高いレベルで検出された。

## 【0106】

この知見に基づき、血管形成におけるCXCR4遺伝子欠損の効果を調べた。卵黄および臍帯の血管は視覚的には正常であった。E18.5のCXCR4-/-胚の組織学的検査では、主な血管である大動脈、大静脈、頸動脈、頸静脈、腹腔動脈、腸間膜動

脈および腸間膜静脈の存在が認められた。その後、器官の血管系を可視化するため、野生型及び変異胚の全組織調製物について、抗PECAM-1抗体で免疫染色した。PECAM-1は胎生期を通じて、すべての内皮細胞において特異的かつ安定に発現することが知られている (Vecchi, A. et al. Eur.J. Cell Biol. 63, 247-255 (1994)、Baldwin, H. S. et al.. Development 120, 2539-2558 (1994))。

#### 【0107】

その結果、E11.5までは胃、小腸、および腸間膜を含む胃腸組織において、高密度に分岐した均一な血管系が野生型と変異型ともに認められた。E12.5付近では、中腸ループに結合している腸間膜において大小の血管が再構成により形成されていることが認められた。E13.5での野生型胚では図3の(a)に示されるように、腸管へ栄養する腸間膜動脈や腸間膜静脈から分岐する多くの大分枝が形成されていた。一方、E13.5でのCXCR4-/-胚の腸間膜では、これらの大分枝が存在せず、その代わりより小さな血管のみが生じていた。顕微鏡を用いた組織学的分析によれば、E13.5での野生型胚の腸間膜には腸間膜動脈や腸間膜静脈が認められ、これより分岐した血管は動脈、静脈が対となっていた(図3の(c))。これとは対照的に、CXCR4-/-胚の大部分の血管は図4の(d)に見られるように対ではなく一本であった。ただし、変異胚の腸間膜内の腸間膜動脈や腸間膜静脈は正常であった。E17.5での野生型胚では、腸間膜の大型の血管は多くの分枝を出し腸管に達していた(図3の(e)と(g))。しかしながら、CXCR4-/-胚ではこのような腸間膜の大型の血管に相当する血管は実質的に欠損していた(図4(f)と図3の(g))。また、変異腸間膜では異常な分岐を示す大型の血管が認められた(図4(f)と図3の(g))。このような血管系の欠損により、大部分のE16.5の変異胚の小腸には多数の出血様病変が見られた。この病変は腸を支配する循環系の異常によるものと考えられる(図4の(i))。

#### 【0108】

以上の結果から、CXCR4は、小腸の正常な血管形成に必須であることが示された。その作用機序としてはCXCR4は、腸間膜の血管の分岐及び／又は再構成に関与していると考えられる。

#### 【0109】

胃の場合、野生型胚では、E13.5までに、小弯側の間葉から分岐する大型の血管が形成され、腹側および背側表面全体に分布している(図5の(a)、(c))。組織学的解析によると、この血管はE15.5の野生型マウスにおいて、図5の(c)内に挿入した写真で示されるように、静脈と動脈が対をなしていた。しかしながら、これに相当する血管は変異胚には認められなかった(図5の(b)、(d))。胃を取り巻く小血管ネットワークの形成は、変異胚でも正常に見えた(図5の(d))。

#### 【0110】

E18.5での変異胚の胃腸の組織学的分析では、器官形成に何等異常は認められなかった。例えば、変異マウスの胃、腸管の平滑筋層は、外層および内層それぞれ、縦方向および垂直方向に正常に認められた。

#### 【0111】

図3は、CXCR4-/-胚における胃腸系血管欠損を示す写真であり、野生型((a)、(c)、(e)、(g))の腸間膜および腸の、抗PECAM-1抗体による免疫染色を示す写真である。(a)はE13.5での腸間膜と中腸ループ領域を示す。(e)はE17.5での空腸を示す。(g)はE17.5での空腸を示す。(c)はE13.5での染色した腸間膜の断面を示す。(a)、(e)、(g)での矢印は、野生型腸間膜の 小腸を栄養する上腸間膜動脈又は静脈よりの大型の分枝を示す。

#### 【0112】

また、図4は、同様にCXCR4-/-胚における胃腸系血管欠損を示す写真であり、変異型((b)、(d)、(f)、(h))の腸間膜および腸の、抗PECAM-1抗体による免疫染色を示す写真である。(b)はE13.5での腸間膜と中腸ループ領域を示す。(f)はE17.5での空腸を示す。(h)はE17.5での空腸を示す。(d)はE13.5での染色した腸間膜の断面を示す。(i)はE16.5での変異マウスの未染色の腸出血様病変を示す。(f)、(h)での矢印は、変異マウスの走行、分岐が異常な大型の血管を示す。

#### 【0113】

また、図5は、抗PECAM-1抗体による胃の免疫染色の結果を示す写真である。(a)と(b)がE13.5、(c)と(d)はE15.5、(a)と(c)は野生型、(

b) と (d) は変異型を示す。 (c) の写真内に挿入された写真は、E15.5での染色した胃の壁内の大型の血管のヘマトキシリン-エオジン染色された断面を示す。 (a) と (c) の矢印は野生型にのみ観察される大型の血管を示す。 duは十二指腸、 pは中間腸ループの近位を、 dmは中間腸ループの末梢部、 aは動脈、 vは静脈を示す。

#### 【O 1 1 4】

これらの知見は、 CXCR4-/マウスにおける血管形成の異常は、消化管そのものの異常による二次的なものではないことを示している。このような血管形成の異常と同様の異常がPBSF/SDF-1欠損マウスでも認められた。

#### 【O 1 1 5】

*in situ*ハイブリダイゼーション分析によれば、 E12.5の野生型胚の腸間膜、 腸壁及び胃壁の血管内皮細胞にCXCR4転写物が発現していることが示された(図6の (b) と (e) )。特に、 腹間膜動脈の分枝の内皮細胞に強い発現が観察された(図6の (b) 、 (e) )。これとは対照的に、 PBSF/SDF-1は腹間膜の内皮細胞をとりまく間葉細胞において高いレベルで発現していたが、 腸と胃の壁や内皮細胞には発現していなかった(図6の (c) )。

#### 【O 1 1 6】

図6は*in situ*ハイブリダイゼーションによる胃腸組織でのCXCR4およびPBSF/SDF-1の発現の解析を示す写真である。野生型の中腸ループにつながる腹間膜の連続切片を用いて、 1枚はヘマトキシリン-エオジンで染色し((a) と (d) )、 もう1枚はCXCR4特異的プローブとハイブリダイズし((b) と (e) )、 更にもう1枚はPBSF/SDF-1特異的プローブとハイブリダイズした(c)。 (d) と (e) は、 (a) と (b) の上腹間膜動脈から生じた分岐血管の拡大図であり、 血管内皮細胞にCXCR4の強い発現があることが示された。 (b) と (e) の矢印矢頭は、 腹間膜血管のCXCR4の発現が認められる内皮細胞を示す。 (c) 腹間膜内の内皮細胞を取り巻く間葉細胞でPBSF/SDF-1が発現している。 (f) は、 野生型E18.5胚の骨髄の断面であり、 造血細胞内でCXCR4が発現し、 紡錐型のストローマ細胞で発現していない。 mは、 腹間膜、 iは、 小腸、 aは上腹間膜動脈、 vは上腹間静脈を示す。

## 【0117】

得られた発現パターンは、間葉細胞により產生されたPBSF/SDF-1が内皮細胞上のCXCR4に作用することを示し、これより腸間膜の間葉において極めて重要な役割を果たすサイトカインによるパラクラインシグナルの存在が強く示唆される。このことからCXCR4-/-およびPBSF/SDF-1-/-の胃で大血管を欠損する表現型も、胃の小弯に沿う間葉での血管の分岐または再構成の異常による結果である可能性がある。

## 【0118】

他の器官で血管系を調べるため、卵黄嚢、脳、心臓を抗PECAM-1モノクローナル抗体で染色した。卵黄嚢(E12.5,E14.5)、頭領域(E11.5)、心臓(E12.5-E14.5)の大および小血管の形成は、CXCR4-/-、PBSF/SDF-1-/-と、野生型の間で明らかな差はなかった。

## 【0119】

以上の実験結果をまとめると、CXCR4とPBSF/SDF-1は血管内皮細胞に作用して血管分岐又は再構成を制御することにより、胃腸組織へ供給する成熟血管系の形成に必須であることが示された。

## 【0120】

フローサイトメトリー分析によると、CXCR4-/-マウスの胎仔肝臓のB細胞前駆細胞が極めて減少していることが明らかとなった。組織学的分析では、骨髓腔の骨髄球系細胞およびその前駆細胞が認められなかった。さらに、E18.5の変異マウスの心臓では心室中隔の膜性部の欠損が見いだされた。これらの異常はPBSF/SDF-1欠損マウスで観察された表現型と非常に似ており、CXCR4が、PBSF/SDF-1の主要な生理的受容体であるという考えを支持する。

*in situ*ハイブリダイゼーションによりE18.5での野生型マウスの骨髓においては、造血細胞においてCXCR4転写物が発現していたがPBSF/SDF-1転写物の発現が認められた紡錘型ストローマ細胞にはCXCR4転写物が発現されなかった(図(Fig3 d))。これらの発現パターンの結果は、骨髓においてパラクラインシグナルの存在を意味するものである。

## 【0121】

今まで報告されたFlk-1、Tie-2などの受容体チロシンキナーゼ(RTKs)と、VEGF、アンジオポイエチン-1、PDGF-Bのようなそのリガンドの変異マウスを用いた解析によれば、それらは血管系の発育に重要な役割を果たし、それらの多くは、発生における血管形成のごく初期過程及び体のいたるところでの血管形成（卵黄嚢、必要、胚外の脈管構造を含む）に必要であることが知られている(Shalaby, F. et al. *Nature* 376, 62-66 (1995)、Fong, G.-H., Rossant, J., Gertsenstein, M. & Breitman, M. L. *Nature* 376, 66-70 (1995)、Dumont, D.J. et al. *Genes Dev.* 8, 1897-1909 (1994)、Sato, T. N. et al. *Nature* 376, 70-74 (1995)、Carmeliet, P. et al. *Nature* 380, 435-439 (1996)、Ferrara, N. et al. *Nature* 380, 439-442 (1996)、Suri, C. et al. *Cell* 87, 1171-1180 (1996))。

。

## 【0122】

これとは対照的に、CXCR4およびPBSF/SDF-1の作用は発生においてより後期であり、器官特異的である。Tie-2およびそのリガンドであるアンジオポイエチン-1は、初期の血管系で分岐および／または再構成に必要と考えられている(Sato, T. N. et al. *Nature* 376, 70-74 (1995)、Suri, C. et al. *Cell* 87, 1171-1180 (1996))。消化管での成熟血管系形成における役割は明らかでない。また、Tie-2又はアンジオポイエチン-/-マウスで観察される卵黄嚢血管系における明確な異常は、CXCR4またはPBSF/SDF-1-/-マウスでは認められなかった。一方、PF4(Majone, T. E. et al. *Science* 247, 77-79 (1990))、IL-8(Koch, A. E. et al. *Science* 258, 1798-1801 (1992))、IP-10(Luster, A. D. et al., *J. Exp. Med.* 182, 219-231 (1995))、およびGro $\beta$ (Cao, Y. H., et al., *J. J. Exp. Med.* 182, 2069-2077 (1995))といったCXCケモカインも血管新生制御因子であることが報告されている。しかし、内皮細胞でのレセプターの発現や生理学的役割はいまだ解明されていない。凝固因子V(Cui, J., et al. *Nature* 384, 66-68 (1996))及び組織因子(Carmeliet, P. et al. *Nature* 383, 78-75 (1996))は、卵黄嚢血管系に必須であることが示されているが、これらの因子がいかなる受容体を介して作用するかは明らかでない。

## 【0123】

以上の背景から、本発明はケモカインと7回膜貫通Gタンパク質共役型受容体という血管形成に必須の新規なシグナル系の存在を示したと言える。

#### 【0124】

最近、ヘテロ三量体GTP結合タンパク質G $\alpha$ 13の $\alpha$ サブユニットを欠損するマウスでは、卵黄嚢の血管系が形成されないこと及び胚体の小血管が拡大するなどの異常があることが示された。その表現型はCXCR4欠損マウスとは異なるが、CXCR4がG $\alpha$ 13と共に共役する可能性について検討する必要はある。

#### 【0125】

CXCR4とCCR5は、それぞれT細胞系親和性およびマクロファージ親和性のHIV-1株が宿主細胞に感染するのに必須のコレセプターであることが知られている(Feng, Y., et al., Science 272, 872-877 (1996)、Fauci, A. S. Nature 384, 529-584 (1996))。このうちCCR5を欠損したホモ変異体の人々が見出されており、これらの人々は、HIV-1感染に抵抗性であり何ら健康に問題はない(Liu, R et al. Cell 86, 367-377 (1996)、Samson, M. et al. Nature 382, 722-725(1996)、Dean, M. et al. Science 273, 1856-1861)。

#### 【0126】

しかし、もう一方のCXCR4に関しては、CXCR4欠損マウスが胚時期に致死性であることから、ヒトでのCXCR4ホモ欠損はありえないことが強く示唆された。ただし、T細胞系親和性HIV-1抵抗性の長期生存者においては他の遺伝的要因または生存可能なCXCR4ホモ変異が存在する可能性は残されている。

【0127】

## 【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：352

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Met	Glu	Gly	Ile	Ser	Ile	Tyr	Thr	Ser	Asp	Asn	Tyr	Thr	Glu	Glu
5									10					15
Met	Gly	Ser	Gly	Asp	Tyr	Asp	Ser	Met	Lys	Glu	Pro	Cys	Phe	Arg
20									25					30
Glu	Glu	Asn	Ala	Asn	Phe	Asn	Lys	Ile	Phe	Leu	Pro	Thr	Ile	Tyr
35									40					45
Ser	Ile	Ile	Phe	Leu	Thr	Gly	Ile	Val	Gly	Asn	Gly	Leu	Val	Ile
50									55					60
Leu	Val	Met	Gly	Tyr	Gln	Lys	Leu	Arg	Ser	Met	Thr	Asp	Lys	
65									70					75
Tyr	Arg	Leu	His	Leu	Ser	Val	Ala	Asp	Leu	Leu	Phe	Val	Ile	Thr
80									85					90
Leu	Pro	Phe	Trp	Ala	Val	Asp	Ala	Val	Ala	Asn	Trp	Tyr	Phe	Gly
95									100					105
Asn	Phe	Leu	Cys	Lys	Ala	Val	His	Val	Ile	Tyr	Thr	Val	Asn	Leu
110									115					120
Tyr	Ser	Ser	Val	Leu	Ile	Leu	Ala	Phe	Ile	Ser	Leu	Asp	Arg	Tyr
125									130					135
Leu	Ala	Ile	Val	His	Ala	Thr	Asn	Ser	Gln	Arg	Pro	Arg	Lys	Leu
140									145					150
Leu	Ala	Glu	Lys	Val	Val	Tyr	Val	Gly	Val	Trp	Ile	Pro	Ala	Leu

	155	160	165											
Leu	Leu	Thr	Ile	Pro	Asp	Phe	Ile	Phe	Ala	Asn	Val	Ser	Glu	Ala
	170							175						180
Asp	Asp	Arg	Tyr	Ile	Cys	Asp	Arg	Phe	Tyr	Pro	Asn	Asp	Leu	Trp
	185							190						195
Val	Val	Val	Phe	Gln	Phe	Gln	His	Ile	Met	Val	Gly	Leu	Ile	Leu
	200							205						210
Pro	Gly	Ile	Val	Ile	Leu	Ser	Cys	Tyr	Cys	Ile	Ile	Ile	Ser	Lys
	215							220						225
Leu	Ser	His	Ser	Lys	Gly	His	Gln	Lys	Arg	Lys	Ala	Leu	Lys	Thr
	230							235						240
Thr	Val	Ile	Leu	Ile	Leu	Ala	Phe	Phe	Ala	Cys	Trp	Leu	Pro	Tyr
	245							250						255
Tyr	Ile	Gly	Ile	Ser	Ile	Asp	Ser	Phe	Ile	Leu	Leu	Glu	Ile	Ile
	260							265						270
Lys	Gln	Gly	Cys	Glu	Phe	Glu	Asn	Thr	Val	His	Lys	Trp	Ile	Ser
	275							280						285
Ile	Thr	Glu	Ala	Leu	Ala	Phe	Phe	His	Cys	Cys	Leu	Asn	Pro	Ile
	290							295						300
Leu	Tyr	Ala	Phe	Leu	Gly	Ala	Lys	Phe	Lys	Thr	Ser	Ala	Gln	His
	305							310						315
Ala	Leu	Thr	Ser	Val	Ser	Arg	Gly	Ser	Ser	Leu	Lys	Ile	Leu	Ser
	320							325						330
Lys	Gly	Lys	Arg	Gly	Gly	His	Ser	Ser	Val	Ser	Thr	Glu	Ser	Glu
	335							340						345
Ser	Ser	Ser	Phe	His	Ser	Ser								
	350													

配列番号：2

配列の長さ：1588

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA/tmRNA

配列

ATG GAG GGG ATC AGT ATA TAC ACT TCA GAT AAC TAC ACC GAG GAA 45  
ATG GCC TCA GGG GAC TAT GAC TCC ATG AAG GAA CCC TGT TTC CGT 90  
GAA GAA AAT GCT AAT TTC AAT AAA ATC TTC CTG CCC ACC ATC TAC 135  
TCC ATC ATC TTC TTA ACT GGC ATT GTG GGC AAT GGA TTG GTC ATC 180  
CTG GTC ATG GGT TAC CAG AAG AAA CTG AGA AGC ATG ACG GAC AAG 225  
TAC AGG CTG CAC CTG TCA GTG GCC GAC CTC CTC TTT GTC ATC ACG 270  
CTT CCC TTC TGG GCA GTT GAT GCC GTG GCA AAC TGG TAC TTT GGG 315  
AAC TTC CTA TGC AAG GCA GTC CAT GTC ATC TAC ACA GTC AAC CTC 360  
TAC AGC AGT GTC CTC ATC CTG GCC TTC ATC AGT CTG GAC CGC TAC 405  
CTG GCC ATC GTC CAC GCC ACC AAC AGT CAG AGG CCA AGG AAG CTG 450  
TTG GCT GAA AAG GTG GTC TAT GTT GGC GTC TGG ATC CCT GCC CTC 495  
CTG CTG ACT ATT CCC GAC TTC ATC TTT GCC AAC GTC AGT GAG GCA 540  
GAT GAC AGA TAT ATC TGT GAC CGC TTC TAC CCC AAT GAC TTG TGG 585  
GTG GTT GTG TTC CAG TTT CAG CAC ATC ATG GTT GGC CTT ATC CTG 630  
CCT GGT ATT GTC ATC CTG TCC TGC TAT TGC ATT ATC ATC TCC AAG 675  
CTG TCA CAC TCC AAG GCC CAC CAG AAG CGC AAG GCC CTC AAG ACC 720  
ACA GTC ATC CTC ATC CTG GCT TTC GCC TGT TGG CTG CCT TAC 765  
TAC ATT GGG ATC AGC ATC GAC TCC TTC ATC CTC CTG GAA ATC ATC 810  
AAG CAA GGG TGT GAG TTT GAG AAC ACT GTG CAC AAG TGG ATT TCC 855  
ATC ACC GAG GCC CTA GCT TTC CAC TGT TGT CTG AAC CCC ATC 900  
CTC TAT GCT TTC CTT GGA GCC AAA TTT AAA ACC TCT GCC CAG CAC 945  
GCA CTC ACC TCT GTG AGC AGA GGG TCC AGC CTC AAG ATC CTC TCC 990  
AAA GGA AAG CGA GGT GGA CAT TCA TCT GTT TCC ACT GAG TCT GAG 1035

TCT TCA ACT TTT CAC TCC AGC TAA CACAGATGTA AAAGACTTTT TTTTAT 1085  
ACGATAAATA ACTTTTTTT AAGTTACACA TTTTCAGAT ATAAAAGACT GACCAATATT 1145  
GTACAGTTT TATTGCTGT TGGATTTTG TCTTGTGTTT CTTAGTTT TGTGAAGTTT 1205  
AATTGACTTA TTTATATAAA TTTTTTTGT TTCATATTGA TGTGTGTCTA GGCAGGACCT 1265  
GTGGCCAAGT TCTTAGTTGC TGTATGTCTC GTGGTAGGAC TGTAGAAAAG GGAACGTGAAAC 1325  
ATTCCAGAGC GTGTAGTTAA TCACGTAAG CTAGAAATGA TCCCCAGCTG TTTATGCATA 1385  
GATAATCTCT CCATTCCCGT GGAACGTTT TCCTGTTCTT AAGACGTGAT TTTGCTGTAG 1445  
AAGATGGCAC TTATAACCAA AGCCCAAAGT GGTATAGAAA TGCTGGTTT TCAGTTTCA 1505  
GGAGTGGTT GATTCAGCA CCTACAGTGT ACAGTCTTGT ATTAAGTTGT TAATAAAAGT 1565  
ACATGTTAAA CTTAAAAAAA AAA 1588

配列番号：3

配列の長さ : 359

## 配列の型：アミノ酸

## トポロジー：直鎖状

## 配列の種類：ペプチド

配列

Met Glu Pro Ile Ser Val Ser Ile Tyr Thr Ser Asp Asn Tyr Ser			
	5	10	15
Glu Glu Val Gly Ser Gly Asp Tyr Asp Ser Asn Lys Glu Pro Cys			
	20	25	30
Phe Arg Asp Glu Asn Val His Phe Asn Arg Ile Phe Leu Pro Thr			
	35	40	45
Ile Tyr Phe Ile Ile Phe Leu Thr Gly Ile Val Gly Asn Gly Leu			
	50	55	60
Val Ile Leu Val Met Gly Tyr Gln Lys Lys Leu Arg Ser Met Thr			
	65	70	75
Asp Lys Tyr Arg Leu His Leu Ser Val Ala Asp Leu Leu Phe Val			
	80	85	90

Ile Thr Leu Pro Phe Trp Ala Val Asp Ala Met al.a Asp Trp Tyr  
 95 100 105  
 Phe Gly Lys Phe Leu Cys Lys Ala Val His Ile Ile Tyr Thr Val  
 110 115 120  
 Asn Leu Tyr Ser Ser Val Leu Ile Leu Ala Phe Ile Ser Leu Asp  
 125 130 135  
 Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Thr Asn Ser Gln Arg Pro Arg  
 140 145 150  
 Lys Leu Leu Ala Glu Lys Ala Val Tyr Val Gly Val Trp Ile Pro  
 155 160 165  
 Ala Leu Leu Leu Thr Ile Pro Asp Phe Ile Phe Ala Asp Val Ser  
 170 175 180  
 Gln Gly Asp Ile Ser Gln Gly Asp Asp Arg Tyr Ile Cys Asp Arg  
 185 190 195  
 Leu Tyr Pro Asp Ser Leu Trp Met Val Val Phe Gln Phe Gln His  
 200 205 210  
 Ile Met Val Gly Leu Ile Leu Pro Gly Ile Val Ile Leu Ser Cys  
 215 220 225  
 Tyr Cys Ile Ile Ile Ser Lys Leu Ser His Ser Lys Gly His Gln  
 230 235 240  
 Lys Arg Lys Ala Leu Lys Thr Thr Val Ile Leu Ile Leu Ala Phe  
 245 250 255  
 Phe Ala Cys Trp Leu Pro Tyr Tyr Val Gly Ile Ser Ile Asp Ser  
 260 265 270  
 Phe Ile Leu Leu Gly Val Ile Lys Gln Gly Cys Asp Phe Glu Ser  
 275 280 285  
 Ile Val His Lys Trp Ile Ser Ile Thr Glu Ala Leu Ala Phe Phe  
 290 295 300  
 His Cys Cys Leu Asn Pro Ile Leu Tyr Ala Phe Leu Gly Ala Lys

305	310	315
Phe Lys Ser Ser Ala Gln His Ala Leu Asn Ser Met Ser Arg Gly		
320	325	330
Ser Ser Leu Lys Ile Leu Ser Lys Gly Lys Arg Gly Gly His Ser		
335	340	345
Ser Val Ser Thr Glu Ser Glu Ser Ser Phe His Ser Ser		
350	355	

配列番号 : 4

配列の長さ : 1758

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNAatomRNA

配列

ATG GAA CCG ATC AGT GTG AGT ATA TAC ACT TCT GAT AAC TAC TCT 45  
 GAA GAA GTG GGG TCT GGA GAC TAT GAC TCC AAC AAG GAA CCC TGC 90  
 TTC CGG GAT GAA AAC GTC CAT TTC AAT AGG ATC TTC CTG CCC ACC 135  
 ATC TAC TTC ATC ATC TTC TTG ACT GGC ATA GTC GGC AAT GGA TTG 180  
 GTG ATC CTG GTC ATG GGT TAC CAG AAG AAG CTA AGG AGC ATG ACG 225  
 GAC AAG TAC CGG CTG CAC CTG TCA GTG GCT GAC CTC CTC TTT GTC 270  
 ATC ACA CTC CCC TTC TGG GCA GTT GAT GCC ATG GCT GAC TGG TAC 315  
 TTT GGG AAA TTT TTG TGT AAG GCT GTC CAT ATC ATC TAC ACT GTC 360  
 AAC CTC TAC AGC AGC GTT CTC ATC CTG GCC TTC ATC AGC CTG GAC 405  
 CGG TAC CTC GCC ATT GTC CAC GCC ACC AAC AGT CAA AGG CCA AGG 450  
 AAA CTG CTG GCT GAA AAG GCA GTC TAT GTG GGC GTC TGG ATC CCA 495  
 GCC CTC CTC CTG ACT ATA CCT GAC TTC ATC TTT GCC GAC GTC AGC 540  
 CAG GGG GAC ATC AGT CAG GGG GAT GAC AGG TAC ATC TGT GAC CGC 585

CTT TAC CCC GAT AGC CTG TGG ATG GTG GTG TTT CAA TTC CAG CAT 630  
 ATA ATG GTG GGT CTC ATC CTG CCC GGC ATC GTC ATC CTC TCC TGT 675  
 TAC TGC ATC ATC ATC TCT AAG CTG TCA CAC TCC AAG GGC CAC CAG 720  
 AAG CGC AAG GCC CTC AAG ACG ACA GTC ATC CTC ATC CTA GCT TTC 765  
 TTT GCC TGC TGG CTG CCA TAT TAT GTG GGG ATC AGC ATC GAC TCC 810  
 TTC ATC CTT TTG GGA GTC ATC AAG CAA GGA TGT GAC TTC GAG AGC 855  
 ATT GTG CAC AAG TGG ATC TCC ATC ACA GAG GCC CTC GCC TTC TTC 900  
 CAC TGT TGC CTG AAC CCC ATC CTC TAT GCC TTC CTC GGG GCC AAG 945  
 TTC AAA AGC TCT GCC CAG CAT GCA CTC AAC TCC ATG AGC AGA GGC 990  
 TCC AGC CTC AAG ATC CTT TCC AAA GGA AAG CGG GGT GGA CAC TCT 1035  
 TCC GTC TCC ACG GAG TCA GAA TCC TCC AGT TTT CAC TCC AGC TAA 1080  
 CCCTTATGCA AAGACTTATA TAATATATAT ATATATATGA TAAAGAACCTT TTTTATGTTA 1140  
 CACATTTCC AGATATAAGA GACTGACCAG TCTTGTACAG TTTTTTTTT TTTTTAATTG 1200  
 ACTGTTGGGA GTTTATGTTCTCTAGTTT TGTGAGGTTT GACTTAATTAT ATATAAATAT 1260  
 TGTTTTTGT TTGTTTCATG TGAATGAGCG TCTAGGCAGG ACCTGTGGCC AAGTTCTTAG 1320  
 TAGCTGTTTA TCTGTGTGTA GGACTGTAGA ACTGTAGAGG AAGAAACTGA ACATTCCAGA 1380  
 ATGTGTGGTA AATTGAATAA AGCTAGCCGT GATCCTCAGC TGTTGCTGCA TAATCTCTTC 1440  
 ATTCCGAGGA GCACCCCACC CCCACCCCCA CCCCCACCCC ATTCTAAAT TGTTGGTTA 1500  
 TGCTGTGTGA TGGTTGTTT GGTTTTTTT TGTGTTGTT GTTGTGTTT TTTTCTGTAA 1560  
 AAGATGGCAC TTAAAACCAA AGCCTGAAAT GGTGGTAGAA ATGCTGGGT TTTTTTGTT 1620  
 TGTGTTGTTT TTCAGTTTC AAGAGTAGAT TGACTTCAGT CCCTACAAAT GTACAGTCTT 1680  
 GTATTACATT GTTAATAAAA GTCAATGATA AACTAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 1740  
 AAAAAAAAAA AAAAAAAA

1758

配列番号：5

配列の長さ：89

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Met	Asn	Ala	Lys	Val	Val	Val	Val	Leu	Val	Leu	Leu	Thr	Ala	
				5				10				15		
Leu	Cys	Leu	Ser	Asp	Gly	Lys	Pro	Val	Ser	Leu	Ser	Tyr	Arg	Cys
				20				25				30		
Pro	Cys	Arg	Phe	Phe	Glu	Ser	His	Val	Ala	Arg	Ala	Asn	Val	Lys
				35				40				45		
His	Leu	Lys	Ile	Leu	Asn	Thr	Pro	Asn	Cys	Ala	Leu	Gln	Ile	Val
				50				55				60		
Ala	Arg	Leu	Lys	Asn	Asn	Asn	Arg	Gln	Val	Cys	Ile	Asp	Pro	Lys
				65				70				75		
Leu	Lys	Trp	Ile	Gln	Glu	Tyr	Leu	Glu	Lys	Ala	Leu	Asn	Lys	
				80				85						

配列番号：6

配列の長さ：2244

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA/tmRNA

配列

GCACGGGACA GGCGGGCCA CACCCACCGG GGCGAGCTCG GAGGGCGGCG CTCTGGCGG 60  
 AGGGCCCCGC GGCTCGGCC ACCTCGTCG CGGGGCCGGA GAGGGCGGGC 120  
 GGAGGCACGG GGCCTGGAGG CGCCAGGCGG AGGATGCGGG CGACACGGTG GCGGCGGCGA 180  
 CCGCGCGACC GGGCGGGCGG GCGGGCAGGG GCGAGCGGAG GGAGGGAGCG GACTGCCGCA 240  
 GGATCTGTG AGGAAAAATC TTGCGGCCGG CGATTCCCCG CCTTTAACGC GCAGCCTGCA 300  
 CTCCCCCAC CCCACGCAGG GGCGGCCCTT CCCCAACGCG GGCGCCCACT GGCGCCCGCG 360

CGCCGCTCCC CTCCAGCTCG CCTGCCCTC TCACTCTCCG TCAGCCGCAT TGCCCGCTCG 420  
 GCGTCCGGCC CCCGACCCCG CCTCGTCCCG CCGCCGGCCC GCCCGCCCGC GCC 473  
 ATG AAC GCC AAG GTC GTG GTC GTG CTG GTC CTC GTG CTG ACC GCG 518  
 CTC TGC CTC AGC GAC GGG AAG CCC GTC AGC CTG AGC TAC AGA TGC 563  
 CCA TGC CGA TTC TTC GAA AGC CAT GTT GCC AGA GCC AAC GTC AAG 608  
 CAT CTC AAA ATT CTC AAC ACT CCA AAC TGT GCC CTT CAG ATT GTA 653  
 GCC CGG CTG AAG AAC AAC AGA CAA GTG TGC ATT GAC CCG AAG 698  
 CTA AAG TGG ATT CAG GAG TAC CTG GAG AAA GCT TTA AAC AAG TAA 743  
 GCACAACAGC CAAAAAGGAC TTTCCGCTAG ACCCACTCGA GGAAAACTAA AACCTTGTGA 803  
 GAGATGAAAG GGCAAAGACG TGGGGGAGGG GGCCTTAACC ATGAGGACCA GGTGTGTGTG 863  
 TGGGGTGGGC ACATTGATCT GGGATCGGGC CTGAGGTTG CCAGCATTAA GACCCTGCAT 923  
 TTATAGCATA CGGTATGATA TTGCAGCTTA TATTCATCCA TGCCCTGTAC CTGTGCACGT 983  
 TGGAAATTTT ATTACTGGGG TTTTCTAAG AAAGAAATTG TATTATCAAC AGCATTTC 1043  
 AGCAGTTAGT TCCTTCATGA TCATCACAAT CATCATCATT CTCATTCTCA TTTTTAAAT 1103  
 CAACGAGTAC TTCAAGATCT GAATTTGGCT TGTTGGAGC ATCTCCTCTG CTCCCCTGGG 1163  
 GAGTCTGGGC ACAGTCAGGT GGTGGCTAA CAGGGAGCTG GAAAAAGTGT CCTTTCTTCA 1223  
 GACACTGAGG CTCCCGCAGC AGCGCCCCTC CCAAGAGGAA GGCCCTGTG GCACTCAGAT 1283  
 ACCGACTGGG GCTGGGCGCC GCCACTGCCT TCACCTCCTC TTTCAACCTC AGTGATTGGC 1343  
 TCTGTGGGCT CCATGTAGAA GCCACTATTAA CTGGGACTGT GCTCAGAGAC CCCTCTCCCA 1403  
 GCTATTCTA CTCTCTCCCC GACTCCGAGA GCATGCATTA ATCTTGCTTC TGCTTCTCAT 1463  
 TTCTGTAGCC TGATCAGCGC CGCACCCAGGCC GGGAAAGAGGG TGATTGCTGG GGCTCGTGCC 1523  
 CTGCATCCCT CTCCCTCCAG GGCCCTGCC ACAGCTCGGG CCCTCTGTGA GATCCGTCTT 1583  
 TGGCCTCTC CAGAATGGAG CTGGCCCTCT CCTGGGGATG TGTAATGGTC CCCCTGCTTA 1643  
 CCCGCAAAAG ACAAGTCTT ACAGAACAA ATGCAATTAA AAATCTGAGA GCTCGCTTTG 1703  
 AGTGACTGGG TTTGTGATT GCCTCTGAAG CCTATGTATG CCATGGAGGC ACTAACAAAC 1763  
 TCTGAGGTTT CCGAAATCAG AAGCGAAAAA ATCAGTGAAT AAACCATCAT CTTGCCACTA 1823  
 CCCCTCTG AAGCCACAGC AGGGTTTCAG GTTCCAATCA GAACTGTTGG CAAGGTGACA 1883  
 TTTCCATGCA TAAATGCGAT CCACAGAAGG TCCTGGTGGT ATTTGTAAC TTTTGCAAGG 1943  
 CATTTTTTA TATATATTAA TGTGCACATT TTTTTTACG TTTCTTTAGA AAACAAATGT 2003

ATTTCAAAAT ATATTTATAG TCGAACATT CATATATTG AAGTGGAGCC ATATGAATGT 2063  
 CAGTAGTTA TACTTCTCTA TTATCTCAA CTACTGGCAA TTTGTAAAGA AATATATATG 2123  
 ATATATAAAAT GTGATTGCAG CTTTCATG TTAGCCACAG TGTATTTTT CACTTGACT 2183  
 AAAATTGTAT CAAATGTGAC ATTATATGCA CTAGCAATAA AATGCTAATT GTTTCATGGT 2243  
 A 2244

配列番号：7

配列の長さ：89

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Met Asp Ala Lys Val Val Ala Val Leu Ala Leu Val Leu Ala Ala			
	5	10	15
Leu Cys Ile Ser Asp Gly Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys			
	20	25	30
Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser His Ile Ala Arg Ala Asn Val Lys			
	35	40	45
His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val			
	50	55	60
Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln Val Cys Ile Asp Pro Lys			
	65	70	75
Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys Ala Leu Asn Lys			
	80	85	

配列番号：8

配列の長さ：1781

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA/tmRNA

配列

GACCACTTTC CCTCTCGGTC CACCTCGGTG TCCTCTTGCT GTCCAGCTCT GCAGCCTCCG 60  
 GCGCGCCCTC CCCGCCACGC C 81  
 ATG GAC GCC AAG GTC GTC GCC GTG CTG GCC CTG GTG CTG GCG GCG 126  
 CTC TGC ATC AGT GAC GGT AAA CCA GTC AGC CTG AGC TAC CGA TGC 171  
 CCC TGC CGG TTC TTC GAG AGC CAC ATC GCC AGA AAC GTC AAG 216  
 CAT CTG AAA ATC CTC AAC ACT CCA AAC TGT GCC CTT CAG ATT GTT 261  
 GCA CGG CTG AAG AAC AAC AGA CAA GTG TGC ATT GAC CCG AAA 306  
 TTA AAG TGG ATC CAA GAG TAC CTG GAG AAA GCT TTA AAC AAG TAA 351  
 GCACAACAGC CCAAAGGACT TTCCAGTAGA CCCCCGAGGA AGGCTGACAT CCGTGGGAGA 411  
 TGCAAGGGCA GTGGTGGGGA GGAGGGCCTG AACCCCTGGCC AGGATGGCCG GCGGGACAGC 471  
 ACTGACTGGG GTCATGCTAA GGTTGCCAG CATAAAGACA CTCCGCCATA GCATATGGTA 531  
 CGATATTGCA GCTTATATTTC ATCCCTGCC TCGCCCGTGC ACAATGGAGC TTTTATAACT 591  
 GGGGTTTTTC TAAGGAATTG TATTACCTA ACCAGTTAGC TTCATCCCCA TTCTCCTCAT 651  
 CCTCATCTTC ATTTAAAAAA GCAGTGATTA CTTCAAGGGC TGTATTCACT TTGCTTTGGA 711  
 GCTTCTCTT GCCCTGGGGC CTCTGGCAC AGTTATAGAC GGTGGCTTG CAGGGAGCCC 771  
 TAGAGAGAAA CCTTCCACCA GAGCAGAGTC CGAGGAACGC TGCAGGGCTT GTCCTGCAGG 831  
 GGGCGCTCCT CGACAGATGC CTTGTCTGA GTCAACACAA GATCCGGCAG AGGGAGGCTC 891  
 CTTTATCCAG TTCAGTGCCA GGGTCGGGAA GCTTCCTTA GAAGTGATCC CTGAAGCTGT 951  
 GCTCAGAGAC CCTTCCCTAG CCGTTCCCTGC TCTCTGCTTG CCTCCAAACG CATGCTTCAT 1011  
 CTGACTTCCG CTTCTCACCT CTGTAGCCTG ACGGACCAAT GCTGCAATGG AAGGGAGGAG 1071  
 AGTGATGTGG GGTCCCCCT CCCTCTCTTC CCTTTGCTT CCTCTCACTT GGGCCCTTG 1131  
 TGAGATTTT CTTGGCCTC CTGTAGAATG GAGCCAGACC ATCCTGGATA ATGTGAGAAC 1191  
 ATGCCTAGAT TTACCCACAA AACACAAGTC TGAGAATTAA TCATAAACGG AAGTTAAAT 1251  
 GAGGATTG GACCTGGTAA TTGTCCCTGA GTCCTATATA TTTCAACAGT GGCTCTATGG 1311  
 GCTCTGATCG AATATCAGTG ATGAAAATAA TAATAATAAT AATAATAACG AATAAGCCAG 1371

AATCTTGCCTA TGAAGCCACA GTGGGGATTG TGGGTTCCAA TCAGAAATGG AGACAAGATA 1431  
AAACCTGCAT ACATTCTTAT GATCACAGAC GGCCCTGGTG GTTTTGGA ACTATTTACA 1491  
AGGCATTTC TTACATATAT TTTTGTGCAC TTTTATGTT TCTTTGGAAG ACAAAATGTAT 1551  
TTCAGAATAT ATTTGTAGTC AATTCAATAA TTTGAAGTGG AGCCATAGTA ATGCCAGTAG 1611  
ATATCTCTAT GATCTTGAGC TACTGGCAAC TTGTAAAGAA ATATATATGA CATATAAATG 1671  
TATTGTAGCT TTCCGGTGTC AGCCACGGTG TATTTTCCA CTTGGAATGA AATTGTATCA 1731  
ACTGTGACAT TATATGCACT AGCAATAAAA TGCTAATTGT TTCATGCTGT 1781

配列番号：9

配列の長さ：4

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Arg Phe Lys Met

配列番号：10

配列の長さ：4

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Arg Leu Lys Met

配列番号：11

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA<sub>Atom</sub>RNA

配列

TAGCGGCCGC GTTGCATGG AACCGAT 27

配列番号：12

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA<sub>Atom</sub>RNA

配列

GCGTCGACTT TGCATAAGGG TTAGCTG 27

## 【0128】

## 【発明の効果】

CXCR4ノックアウトマウスにおいては血管の形成が抑制されたという本発明による知見に基づき、CXCR4の作用を阻害する物質を有効成分として含有する血管形成抑制剤、また癌組織の維持、拡大において血管形成は必須であることから、抗固形癌剤の作成、及びCXCR4の作用を阻害する物質を有効成分として含有する血管新生を病態形成要因とする疾患の治療剤の作成、さらには、CXCR4の作用を増強する物質を有効成分として含有する組織修復剤の作成に用いることができる。

## 【図面の簡単な説明】

## 【図1】

図1は、CXCR4遺伝子の標的戦略を示す図である。ここで、上は野生型CXCR4対立遺伝子を、中は、標的ベクターを、および下は、予想変異対立遺伝子を示す。また、遺伝子の翻訳領域は黒四角で示される。白四角は5'および3'非翻訳領域を示す。点線は、標的ベクターに使用された相同的な断片を示す。プローブAは、サザンハイブリダイゼーション用の外部プローブである。制限酵素位置はそれぞれ、E、EcoRI；Sh、SphI；X、XhoIである。

## 【図2】

図2の(a)は、野生型(+/+)およびヘテロ変異(+/-)マウスのテールDNAのサンプル分析を示す写真である。プローブAにより同定された、11.8kb野生型および8.2kb標的対立遺伝子のEcoRI-EcoRI断片が示されている。

図2の(b)は、CXCR4発現のRT-PCR增幅分析を示す写真である。全RNAはE18.5の野生型およびホモ変異胚から調製し、さらにCXCR4特異的プライマーで增幅した。RT-PCR增幅はまた、増幅可能なRNAの存在のコントロールとして、普遍的に発現しているG3PDH mRNAを用いた。

## 【図3】

図3は、CXCR4-/−胚における胃腸系血管欠損を示す写真であり、野生型((a)、(c)、(e)、(g))の腸間膜および腸の、抗PECAM-1抗体による免疫染色を示す写真である。(a)はE13.5での腸間膜と中腸ループ領域を示す。(e)はE17.5での空腸を示す。(g)はE17.5でのより遠位の空腸を示す。(c)はE13.5

での染色した腸間膜の断面を示す。 (a)、(e)、(g) での矢印は、野生型腸間膜の小腸に供給する上腸間膜動脈又は静脈よりの大分枝を示す。

#### 【図4】

図4は、CXCR4-/–胚における胃腸系血管欠損を示す写真であり、変異型( (b) 、 (d) 、 (f) 、 (h) )の腸間膜および腸の、抗PECAM-1抗体による免疫染色を示す写真である。 (b) はE13.5での腸間膜と中腸ループ領域を示す。 (f) はE17.5での空腸を示す。 (h) はE17.5でのより遠位の空腸を示す。 (d) はE13.5での染色した腸間膜の断面を示す。 (i) はE16.5での変異マウスの未染色の腸出血様病変を示す。 (f) 、 (h) での矢印は、変異マウスの走行、分岐が異常な大型の血管を示す。

#### 【図5】

図5は、抗PECAM-1抗体による胃の免疫染色の結果を示す写真である。 (a) と (b) がE13.5、 (c) と (d) はE15.5、 (a) と (c) は野生型、 (b) と (d) は変異型を示す。 (c) の写真内に挿入された写真は、E15.5での染色した胃の壁内の大型の血管のヘマトキシリン-エオジン染色された断面を示す。 (a) と (c) の矢印は野生型にのみ観察される大型の血管を示す。 duは十二指腸、 pは中間腸ループの近位を、 dmは中間腸ループの末梢部、 aは動脈、 vは静脈を示す。

#### 【図6】

図6はin situハイブリダイゼーションによる胃腸組織でのCXCR4およびPBSF/SDF-1の発現を示す写真である。野生型の中腸ループにつながる腸間膜の連続切片において、ヘマトキシリン-エオジンで染色し( (a) と (d) )、そしてCXCR4特異的プローブとハイブリダイズし( (b) と (e) )、PBSF/SDF-1特異的プローブとハイブリダイズした (c) 。 (d) と (e) は、 (a) と (b) の上腸間膜動脈から生じる血管の拡大図であり、血管内皮細胞にCXCR4の強い発現を認めた。 (b) と (e) の矢印矢頭は、腸間膜血管の染色された内皮細胞を示す。 (c) 腸間膜内の内皮細胞を取り巻く間葉細胞にPBSF/SDF-1が発現している。 (f) は、野生型E18.5胚の骨髄の断面であり、造血細胞にCXCR4が発現し、紡錘型のストローマ細胞には発現していない。 mは、腸間膜、 iは、小腸、 aは上腸間膜動脈、 v

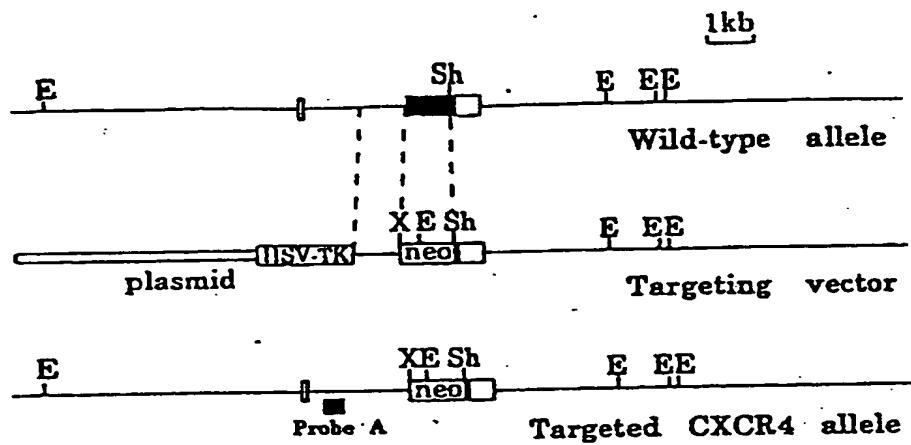
は上腸間静脈を示す。

代理人弁理士 長谷川 芳樹  
同 杉本 博司

【書類名】

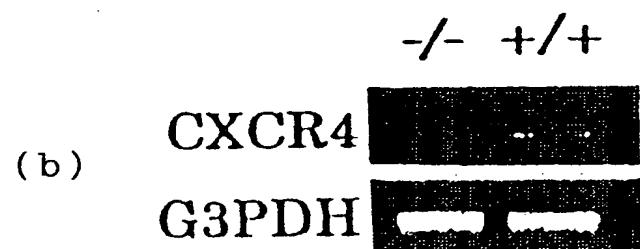
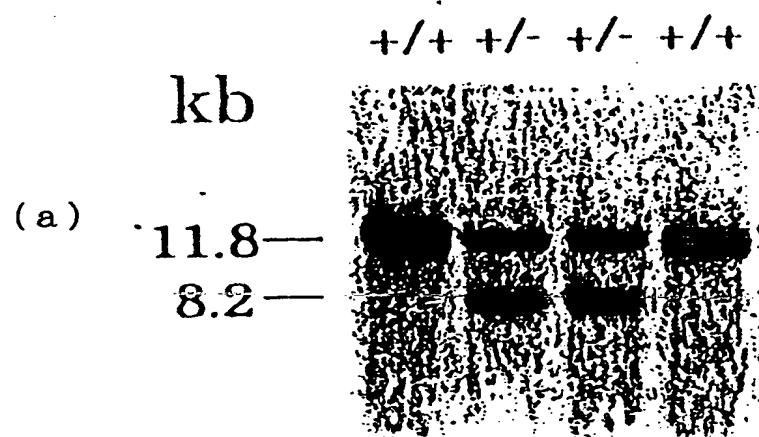
図面

【図1】



【図2】

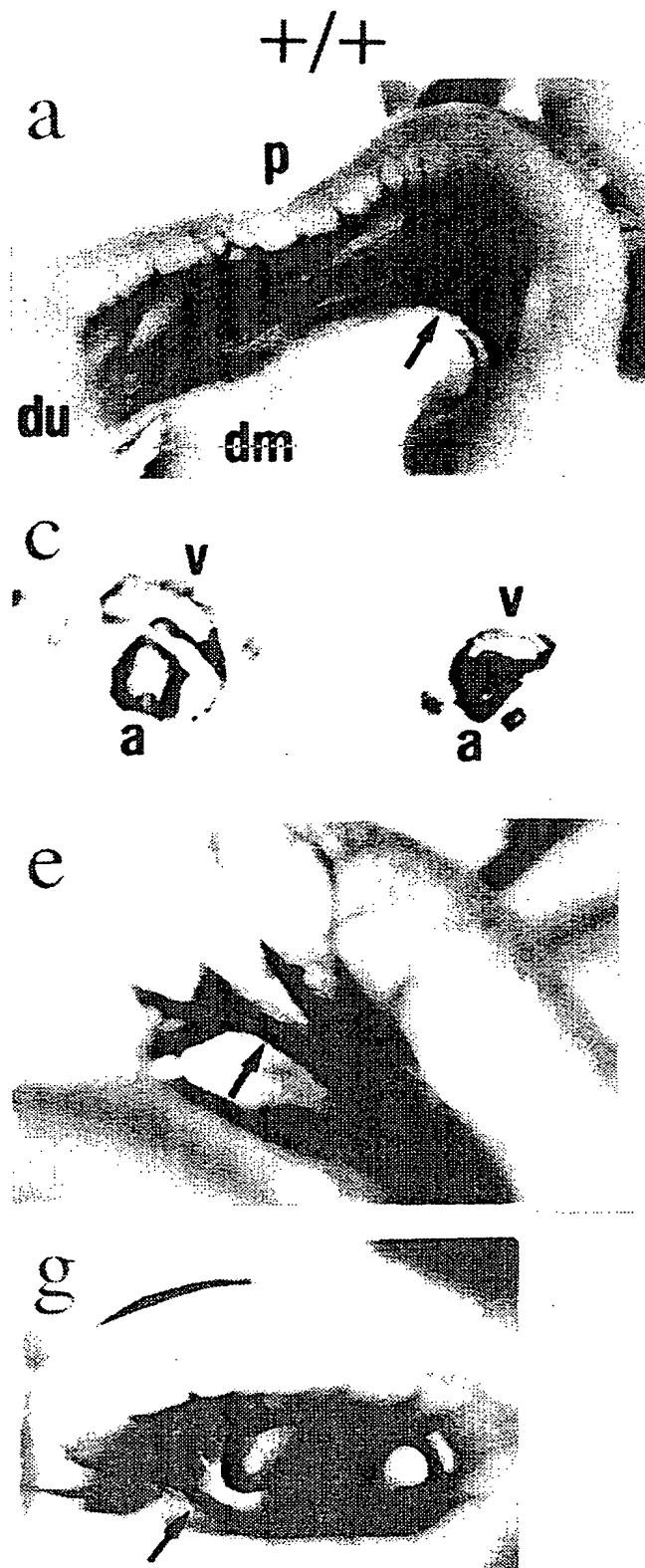
図面代用写真



特平10-09544

【図3】

図面代用写真

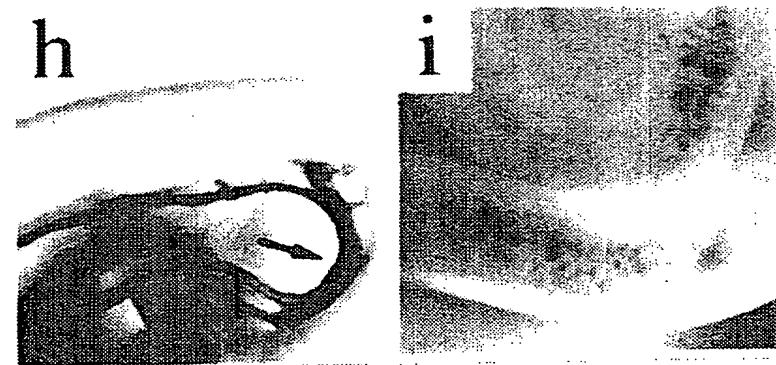
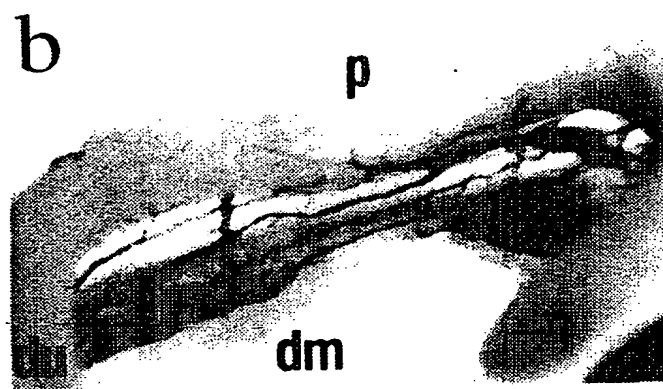


特平10-09544

【図4】

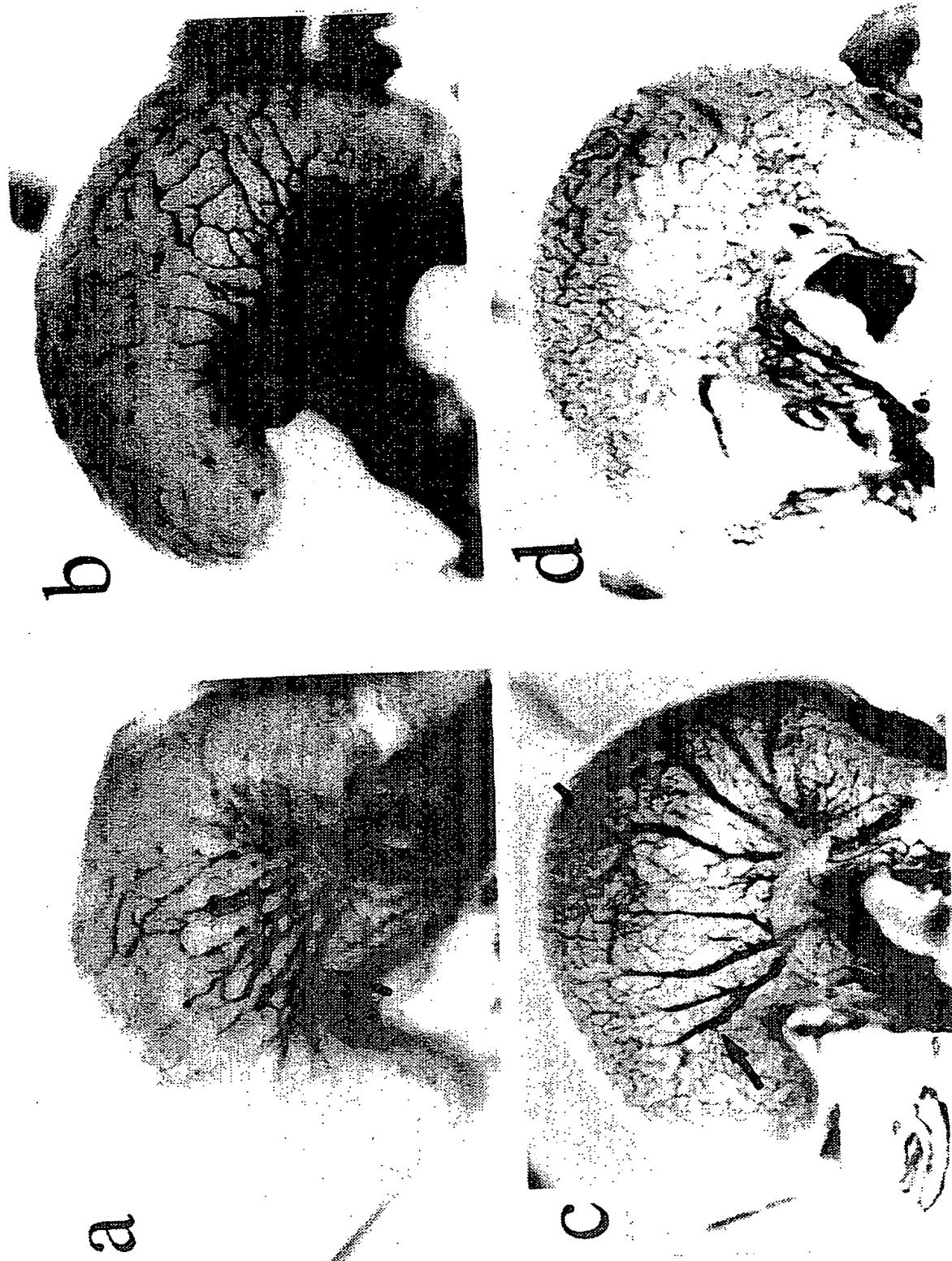
圖面代用等真

-/-



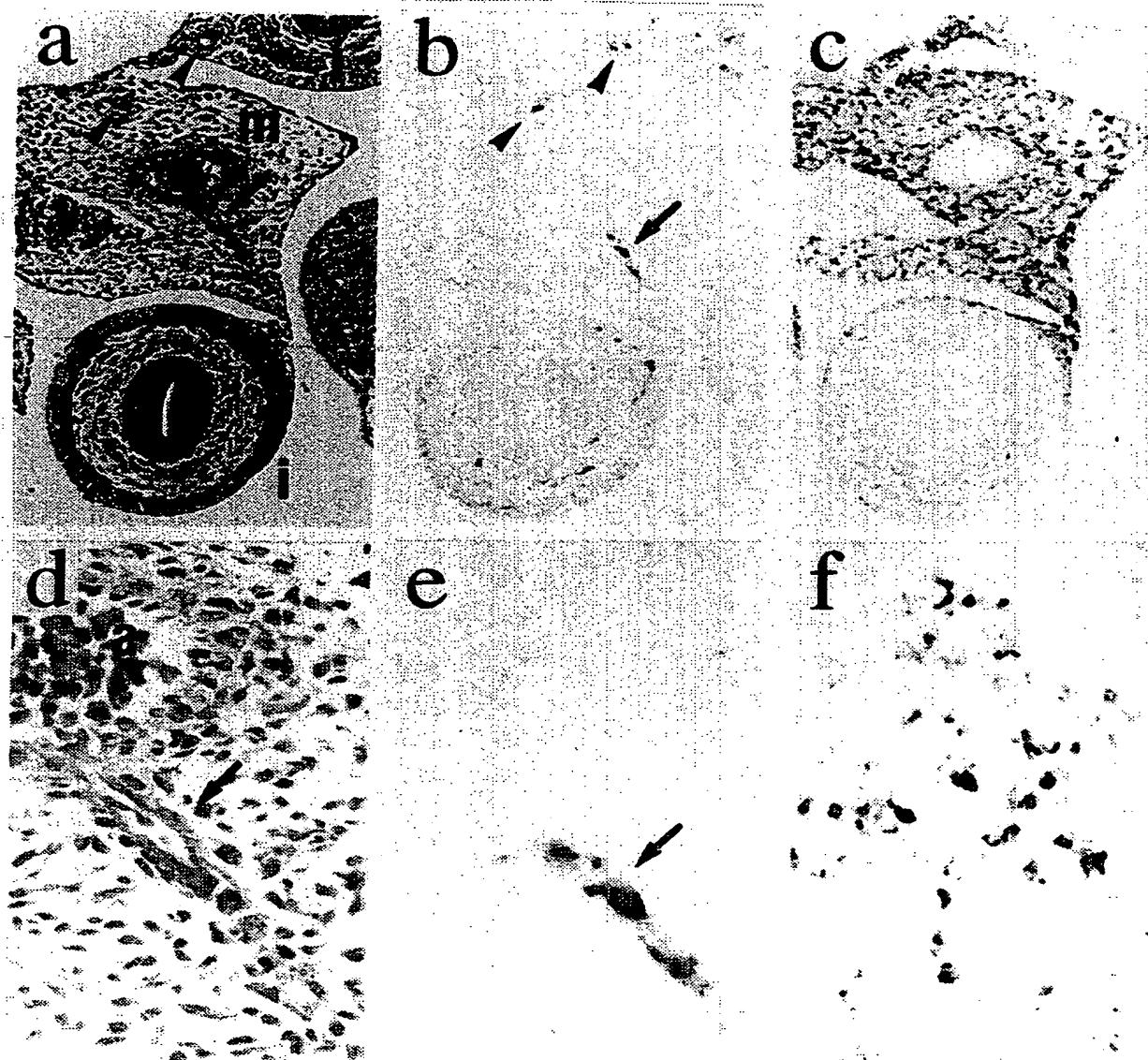
【図5】

画面代用写真



【図6】

図面代用写真



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規な血管形成抑制剤、抗固形癌剤、及び血管新生を病態形成要因とする疾患の治療剤の作成、さらには、CXCR4の作用を増強する物質を有効成分として含有する組織修復剤を提供する。

【解決手段】 本発明による、CXCR4ノックアウトマウスにおいては血管の形成が抑制されるという知見に基づき、CXCR4の作用を阻害する物質を有効成分として含有する血管形成抑制剤、また、癌組織の維持、拡大において血管形成は必須であることから、抗固形癌剤の作成、及びCXCR4の作用を阻害する物質を有効成分として含有する血管新生を病態形成要因とする疾患の治療剤の作成、さらには、CXCR4の作用を増強する物質を有効成分として含有する組織修復剤等の作成に用いることができる。

【選択図】 図1

【書類名】 職権訂正データ  
 【訂正書類】 特許願

## &lt;認定情報・付加情報&gt;

## 【特許出願人】

【識別番号】 000157865  
 【住所又は居所】 大阪府富田林市中野町3丁目5番31号  
 【氏名又は名称】 岸本 忠三

## 【特許出願人】

【識別番号】 000003311  
 【住所又は居所】 東京都北区浮間5丁目5番1号  
 【氏名又は名称】 中外製薬株式会社

## 【代理人】

【識別番号】 100088155  
 【住所又は居所】 東京都中央区京橋二丁目13番10号 京橋ナショナルビル6階 創英國際特許事務所  
 【氏名又は名称】 長谷川 芳樹

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100089978  
 【住所又は居所】 東京都中央区京橋二丁目13番10号 京橋ナショナルビル6階 創英國際特許事務所  
 【氏名又は名称】 塩田 辰也

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100092657  
 【住所又は居所】 東京都中央区京橋二丁目13番10号 京橋ナショナルビル6階 創英國際特許事務所  
 【氏名又は名称】 寺崎 史朗

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100094318  
 【住所又は居所】 東京都中央区京橋二丁目13番10号 京橋ナショナルビル6階 創英國際特許事務所  
 【氏名又は名称】 山田 行一

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100107191  
 【住所又は居所】 東京都中央区京橋二丁目13番10号 京橋ナショナルビル6階 創英國際特許事務所  
 【氏名又は名称】 長濱 範明

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100110593

【住所又は居所】

東京都中央区京橋二丁目13番10号 京橋ナショ

ナルビル6階 創英國際特許事務所

【氏名又は名称】

杉本 博司

出願人履歴情報

識別番号 [000157865]

1. 変更年月日 1990年 8月 6日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府富田林市中野町3丁目5番31号

氏 名 岸本 忠三

出願人履歴情報

識別番号 [000003311]

1. 変更年月日 1990年 9月 5日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都北区浮間5丁目5番1号

氏 名 中外製薬株式会社